

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

AMANDA BORGES FERRARI

RESPOSTA IMUNE CELULAR FRENTE À TERAPIA FOTODINÂMICA

São José dos Campos, SP  
2008

**Amanda Borges Ferrari**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR FRENTE À TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Angélica G. Cardoso

São José dos Campos, SP  
2008

F427r

Ferrari, Amanda Borges

Resposta imune celular frente a terapia fotodinâmica./ Amanda Borges  
Ferrari. São José dos Campos: Univap, 2008.

1 Disc Laser.: Color

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale  
do Paraíba, 2008.

1. Sistema Imunológico 2. Terapia Fotodinâmica 3. Resposta Celular. I.  
Cardoso, Maria Angélica Gargione, Orient. II. Título

CDU:615.849

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica, desde que seu uso implique na correta citação da fonte.

Aluna: *Amanda Borges Ferrari*

Data da defesa: *20 de junho de 2008.*

## AMANDA BORGES FERRARI

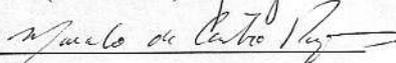
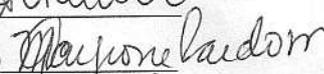
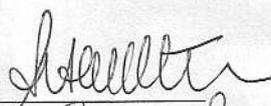
### “RESPOSTA IMUNE CELULAR FRENTE A TERAPIA FOTODINÂMICA”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS VICTOR CANETTIERI (UNIVAP)

Prof. Dra. MARIA ANGÉLICA GARGIONE CARDOSO (UNIVAP)

Prof. Dr. MARCELO DE CASTRO PAZOS (UNIFESP)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 20 de junho de 2008.

Aos meus pais, pelo  
incentivo profissional.  
Ao Eduardo Mayrink  
Por todo amor, ajuda e  
compreensão.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Angélica Gargione Cardoso, obrigada por ter me recebido em seu laboratório, pela sua orientação e pelos novos conhecimentos que adquiri nesse período.

Ao Prof. Dr. Milton Beltrame Junior, por fornecer o fármaco fotossensibilizador, pois sem o qual não teríamos realizado esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Wellington Ribeiro, por consentir que os animais, utilizados nesse trabalho, ficassem no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II (IP&D II).

Ao Prof. Dr. Airton Martin e À Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, por gentilmente autorizarem o uso de equipamentos e reagentes dos seus laboratórios.

Às amigas do laboratório Carolina e Renata, pela grande ajuda durante os experimentos e mais tarde com os resultados. Obrigada!

À UniVap, por incentivar e proporcionar meu aperfeiçoamento profissional.

Aos funcionários da UniVap, pelo atendimento e atenção.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o período de realização desta dissertação.

Ao laboratório CIPAX medicina diagnóstica, por gentilmente fazer as lâminas histológicas analisadas nesse trabalho, pois foram extremamente importantes para a conclusão dessa dissertação.

As minhas amigas Kátia, Milena, Raquel e Tatiana, pela ajuda, incentivo, compreensão, carinho e amizade em todos os momentos da minha vida.

À minha grande família, mãe, pai, irmãs, sobrinha, cunhados e sogros, pelo grande apoio e carinho sem o qual teria sido muito difícil.

A minha nova família, meu marido Eduardo, por existir em minha vida.

... Vou procurá-la a vida inteira  
no mundo todo.

Se tarda o encontro, se não a encontro,  
não desanimo,  
procuro sempre...

Carlos Drummond de Andrade

## RESPOSTA IMUNE CELULAR FRENTE À TERAPIA FOTODINÂMICA

### RESUMO

A Terapia Fotodinâmica é uma promissora modalidade de tratamento do câncer, que envolve a administração de um agente fotossensibilizante que se localiza preferencialmente em células tumorais, seguida pela irradiação com luz de um comprimento de onda apropriado e compatível com o espectro de absorção do fotossensibilizante utilizado. Esta terapia desencadeia uma série de processos fotoquímicos e fotobiológicos, fazendo com que a TFD tenha um efeito significativo sobre o sistema imunológico. O presente trabalho buscou avaliar a capacidade proliferativa assim como a produção de óxido nítrico de esplenócitos, cultivados na presença e/ou ausência de Concanavalina-A (Con-A) (5µg/mL), de camundongos BALB/c isogênicos submetidos à TFD ou não, na ausência de tumor. Paralelamente analisamos o aspecto histológico do baço desses animais. A fim de se estabelecer uma cinética para avaliação desse modelo experimental, os animais foram sacrificados em diferentes tempos: 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a TFD. Foram avaliados paralelamente animais sem tratamento algum, animais que receberam a Ftalocianina de silício-NzPc (0,5 µM/Kg de peso corpóreo) somente e ainda aqueles que foram irradiados com laser (thera lase<sup>®</sup>) com  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz – 10 J/cm<sup>2</sup> e 50 mW/cm<sup>2</sup> somente na região do baço. Verificamos que a produção de óxido nítrico foi mais elevada frente à TFD, um resultado importante, pois o NO tem um efeito citotóxico nas células tumorais. Observamos ainda, uma maior evidência da polpa branca nas lâminas histológicas 24 horas após a administração da NzPc ou TFD. Em nossos experimentos a resposta proliferativa apresentou-se comprometida após a TFD.

**Palavras-chaves:** Terapia Fotodinâmica, óxido nítrico, proliferação celular.

## CELLULAR IMMUNE RESPONSE AND PHOTODYNAMIC THERAPY

### ABSTRACT

The Photodynamic therapy is a promising modality for the treatment of cancer, which involves the administration of a photosensitizer agent which is located preferentially in tumor cells, followed by irradiation with light of an appropriate wavelength and compatible with the absorption spectrum of the photosensitizer used. This therapy triggers a series of photochemical and photobiological processes, causing a significant effect from PDT in the immune system. This study sought to assess the proliferative capacity and the production of nitric oxide from splenocytes, which were cultured in the presence or absence of Concanavalin-A (Con A) (5 $\mu$ g/mL), from BALB/c isogenic mice submitted or not to PDT, in the absence of tumor. Besides, the histological aspect of the spleen from these animals was analyzed. In order to establish a kinetic for evaluation of the experimental model, the animals were sacrificed at different period: 4, 8, 12, 24 and 48 hours after PDT. In parallel were also evaluated animals without any treatment, animals that received the silicon phthalocyanine-NzPc (0.5  $\mu$ M/Kg corporal weight) and those who were only irradiated with laser (thera lase<sup>®</sup>) with  $\lambda$ =685nm, light weight – 10 J/cm<sup>2</sup> e 50 mW/cm<sup>2</sup> in spleen region. We note that the production of nitric oxide was higher after PDT. We also noticed the white pulp in greater evidence in histological slides after 24 hours from NzPc administration or PDT. In our assays the proliferative response was compromised after TFD.

**Keywords:** Photodynamic therapy, nitric oxide, cell proliferation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama de Jablonski simplificado para o processo de fotossensibilização. O corante no estado fundamental ( $S_0$ ) é excitado ao primeiro estado singlete ( $S_1$ ), podendo fluorescer e retornar ao estado fundamental, ou realizar um cruzamento intersistemas para o estado tripleto de mais baixa energia. A reação deste com o oxigênio molecular inicia o processo de produção dos EROs e oxigênio singlete (HERWIG; OBWEGESER; JAKOBER, 1996). .....16
- Figura 2: A produção do óxido nítrico em macrófagos. A ativação da óxido nítrico sintase (iNOS) combina o oxigênio com o nitrogênio guanidino da L-arginina resultando na produção do óxido nítrico, que é tóxico para as bactérias e células tumorais. (1) processo ativado por  $IFN-\gamma$  em macrófago, (2) e desencadeado por  $TNF-\alpha$  (figura adaptada de ROITT; BROSTOFF; MALE, 2001). .....22
- Figura 3: Procedimentos para a realização do experimento. a) contenção do animal para a aplicação endovenosa do fármaco fotossensibilizador (0,5  $\mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo); b) irradiação do laser na região do baço; c) remoção cirúrgica do baço.....27
- Figura 4: Medida de proliferação celular em esplenócitos de animais submetidos ou não a TFD. Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na veia da cauda Ftalocianina de silício - NzPc (0,5  $\mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz – 10  $\text{J/cm}^2$ , 50  $\text{mW/cm}^2$  e 1  $\text{cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na presença e/ou ausência da Con-A por 48 horas. A seguir, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e a absorbância determinada em 540 nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na presença ou ausência de Con-A por 48 horas.....32
- Figura 5:: Dosagem de óxido nítrico na ausência de concanavalina A (Con-A). Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na região da cauda Ftalocianina de silício – NzPc (0,5  $\mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz – 10  $\text{J/cm}^2$ , 50  $\text{mW/cm}^2$  e 1  $\text{cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na ausência da Con-A por 24 e 48 horas. A seguir as células foram submetidas à dosagem de óxido nítrico através do reagente Griess e a absorbância determinada em 540 nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na ausência de Con-A por 24 e 48 horas.....35
- Figura 6: Dosagem de óxido nítrico na presença da concanavalina A (Con-A). Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na região da cauda Ftalocianina de silício – NzPc (0,5  $\mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz – 10  $\text{J/cm}^2$ , 50  $\text{mW/cm}^2$  e 1  $\text{cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na presença da Con-A por 24 e 48 horas. A seguir as células foram submetidas à dosagem de óxido nítrico através do reagente Griess e a absorbância determinada em 540nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na presença de Con-A por 24 e 48 horas. ....38
- Figura 7: Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 12 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; c) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 12 horas da administração da Ftalocianina – NzPc e d) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a Ftalocianina – NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 12 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE. ....41
- Figura 8: Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 24 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; e) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 24 horas da administração da Ftalocianina – NzPc e f) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a

Ftalocianina – NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 24 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE. ....42

Figura 9: Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 48 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; g) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 48 horas da administração da Ftalocianina – NzPc e h) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a Ftalocianina – NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 48 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE. ....43

## ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD - Terapia Fotodinâmica

$\lambda$  - Comprimento de onda

Pc - Ftalocianina

ZnPc - Ftalocianina de zinco

HpD - Derivado de hematoporfirina

HPPH - 2 - (1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (droga utilizada na TFD)

NO - Óxido nítrico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

NOS - Óxido nítrico sintase

SFB - Soro fetal bovino

PBS - Salina tamponada com fosfato

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico)

SDS - Dodecilo sulfato, sal sódica

TRIS - (Hidroximetil) aminometano

APCs - Células apresentadoras de antígenos

NaCl - Cloreto de sódio

KCl - Cloreto de potássio

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  - Fosfato dissódico 12-hidratado

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Fosfato de potássio monobásico

HE - Hematoxilina e Eosina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 Terapia Fotodinâmica .....	15
1.2 Fármacos fotossensibilizadores.....	17
1.2.1 Ftalocianinas .....	18
1.3 Morfologia do baço.....	19
1.4 Terapia fotodinâmica e células do sistema imune .....	19
1.5 Terapia fotodinâmica e Óxido nítrico .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Reagentes e soluções .....	25
3.2 Animais de Experimentação .....	26
3.3 Administração do Fármaco Fotossensibilizador .....	27
3.4 Coleta das Amostras.....	27
3.5 Proliferação e Viabilidade Celular .....	28
3.6 Dosagem de NO.....	28
3.7 Análise Estatística .....	29
3.8 Cortes Histológicos .....	29
3.9 Análise Histológica.....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 Proliferação celular (figura 4) .....	30
4.1.1 Grupo Controle .....	30
4.1.2 Grupo Laser .....	30
4.1.3 Grupo Pc .....	31
4.1.4 Grupo TFD .....	31
4.2 Dosagem de óxido nítrico .....	33
4.2.1 Na ausência de Con-A .....	33
4.3 Histologia .....	39
4.3.1 Grupo controle .....	39
4.3.2 Grupo laser .....	39
4.3.3 Grupo Pc .....	40
4.3.4 Grupo TFD .....	40
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXO A</b> .....	Erro! Indicador não definido.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o entendimento da etiologia genética e a dependência molecular do câncer avançaram de tal modo que permitiu o desenvolvimento de novas e mais efetivas terapias contra esta doença. Dentre estas destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD).

Essa terapia envolve a administração de um fármaco fotossensibilizante que se localiza preferencialmente em tumores, seguido de ativação desse fármaco pela luz em um comprimento de onda específico. A TFD resulta numa seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que causam dano irreversível ao tumor (DOUGHERTY *et al.*, 1998). Sendo assim, a TFD tem um impacto direto sobre as células cancerígenas, produzindo morte por necrose e/ou apoptose. Por último, a TFD também tem um efeito significativo sobre o sistema imunológico, que pode ser tanto imunoestimulatório como imunossupressor (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

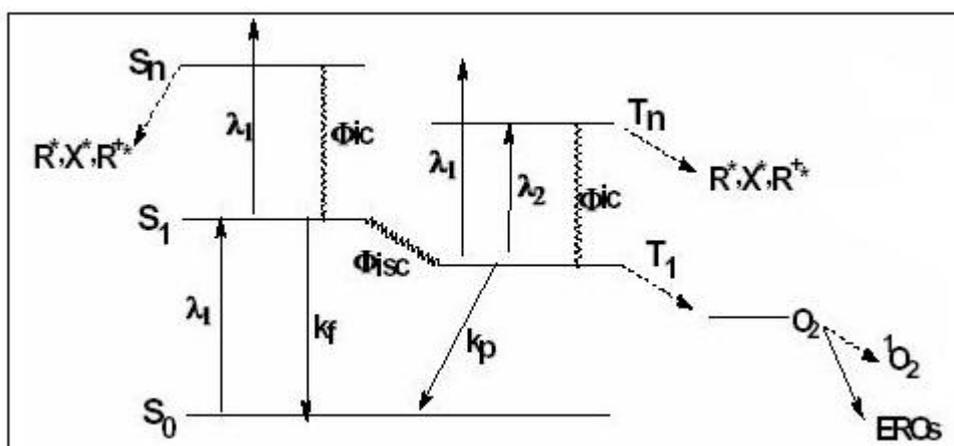
### 1.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que consiste na aplicação de fármacos fotossensibilizadores que se acumulam preferencialmente em tecidos neoplásicos (ARAD *et al.*, 2002). O princípio da TFD está baseado na retenção do fármaco fotossensibilizador, seguido da reação entre esta molécula e a luz na qual o tecido é exposto. Esta fotoativação resulta na formação de substâncias altamente tóxicas, principalmente o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), no interior das células tumorais, resultando em conseqüente indução de morte celular. Existem dois processos básicos responsáveis pela morte celular induzida pela TFD: a indução direta de células tumorais resultando em necrose e/ou apoptose celular e a constrição dos vasos sangüíneos do tumor resultando em morte celular por privação de nutrientes e/ou oxigênio (MORIYAMA *et al.*, 2005).

Após a absorção da luz, o fotossensibilizante gerado é transformado do seu estado fundamental (estado singlete) em um estado eletronicamente excitado (estado triplete). O triplete excitado pode submeter-se a dois tipos de reações. Primeiramente, pode reagir diretamente com o substrato e transferir o elétron em forma de radicais. Estes radicais interagem com o oxigênio para produzir espécies

reativas do oxigênio (EROs) (reação tipo I). Outro caminho é o tripleto transferir sua energia diretamente ao oxigênio, para formar o oxigênio singleto (reação tipo II) (figura 1). Os efeitos de quase todos os fármacos da TFD são dependentes do oxigênio, fazendo com que o fármaco fotossensibilizador não atue em áreas do tecido, onde o oxigênio é ausente. Estudos mostraram que a falta de oxigênio nos tecidos, anulavam os efeitos da TFD, quando utilizado o fármaco fotossensibilizador Photofrin<sup>®</sup> (DOLMANS *et al.*, 2003).

A extensão do dano e da citotoxicidade é multifatorial, ou seja, depende do tipo do fármaco fotossensibilizador, da localização extracelular e intracelular, da dose total administrada, da dose total de exposição da luz, da disponibilidade do oxigênio, e do tempo entre a administração da droga e a exposição da luz. Todos estes fatores são interdependentes (DOLMANS *et al.*, 2003).



**Figura 1: Diagrama de Jablonski simplificado para o processo de fotossensibilização. O corante no estado fundamental ( $S_0$ ) é excitado ao primeiro estado singleto ( $S_1$ ), podendo fluorescer e retornar ao estado fundamental, ou realizar um cruzamento intersistemas para o estado tripleto de mais baixa energia. A reação deste com o oxigênio molecular inicia o processo de produção dos EROs e oxigênio singleto (HERWIG; OBWEGESER; JAKOBER, 1996).**

Dentre vários outros fatores que estão presentes na TFD, a reação citotóxica no tecido alvo, os danos vasculares causados no tumor, a resposta imunológica associada com a estimulação de leucócitos, a liberação de mediadores inflamatórios juntamente com as citocinas, fatores de crescimento e componentes do sistema complemento, são mecanismos importantes para a eficácia da TFD (PAZOS; NADER, 2007).

## 1.2 Fármacos fotossensibilizadores

O primeiro fármaco fotossensibilizador utilizado em estudos clínicos foi o derivado da hematoporfirina (HpD), o qual é uma mistura de porfirinas. Atualmente essa mistura tem o nome comercial de Photofrin<sup>®</sup> e tem sido utilizado em vários países para tratar alguns tipos de câncer como: cervical, pulmonar, de esôfago, bexiga e de estômago, e está sendo ensaiado para outros tipos de tumores, com bons resultados terapêuticos. O Photofrin<sup>®</sup> não é o fármaco fotossensibilizador ideal para todos os tratamentos que utilizam a TFD, pois apresenta vários inconvenientes:

- 1- a droga é uma mistura de porfirinas, que contêm mais de 80% de componentes ativos e 20% de componentes inativos;
- 2- o espectro de absorção da droga apresenta uma banda de absorção mais intensa em 400 nm (baixa penetração na pele) e outra banda menos intensa em 600 nm (alta penetração na pele);
- 3- a acumulação do fármaco na pele provoca uma elevada fotossensibilidade cutânea prolongada nos pacientes (ARAD *et al.*, 2002).

Segundo ARAD *et al.* (2002), o fármaco fotossensibilizador ideal deve cumprir os seguintes requisitos:

### Químicos:

- Composto puro com estabilidade química e fotoquímica;
- Elevado coeficiente de absorção;
- Elevado rendimento quântico de formação de singlete e de espécies reativas de oxigênio.

### Biológicos:

- Solubilidade em fluídos biológicos;
- Localização e retenção seletiva do tumor;
- Mínima toxicidade na ausência de luz;
- ♣ Rápida eliminação do fármaco nos tecidos tumorais e mínima fotossensibilidade cutânea.

### 1.2.1 Ftalocianinas

As ftalocianinas (Pc) são potentes fotossensibilizantes capazes de eliminar células neoplásicas *in vivo* e *in vitro* após irradiação de luz. Esses compostos produzem estados tripletes de meia vida longa na ordem de ms e são eficientes produtores de oxigênio singlete (SIBATA *et al.*, 2000).

Os dois grupos de corantes que têm sido mais extensivamente estudados em relação à TFD são as Ftalocianinas e as Porfirinas. Sob muitos aspectos essas drogas parecem agir similarmente. Até certo ponto, elas são seletivamente absorvidas ou retidas nos tecidos dos tumores, e seu efeito fotossensibilizador se deve, principalmente, a geração do oxigênio singlete (MOAN *et al.*, 1991).

A ftalocianina de zinco (ZnPc) é um dos agentes mais utilizados em TFD porque tem caráter lipofílico e localizam-se em diferentes membranas (mitocondriais, plasmáticas e retículo endoplasmático) (SIBATA *et al.*, 2000).

As ftalocianinas de silício também tem sido usadas e apresentam a possibilidade de inserção de ligantes principalmente nas posições axiais (WHEELER *et al.*, 1984). Em 2006, RÉ e *cols* fizeram o estudo da toxicidade do fármaco fotossensibilizador (NzPc), uma ftalocianina de silício, encapsulada com microesferas utilizando um  $\lambda = 675$  nm e diferentes dosagens de energia 2, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> nas linhagens de células J774. Os resultados obtidos a partir do ensaio de MTT mostraram que a toxicidade da NzPc quando incubada com as células foi de apenas 2% a 7%, enquanto que a fototoxicidade foi de 50%. Esses resultados mostraram a eficácia dessa Pc para uso em TFD (RÉ *et al.*, 2006).

A distribuição do fármaco fotossensibilizador dentro da célula depende da rota pela qual ele entra e também das suas propriedades físico-químicas, entre elas: ser hidrofóbica/hidrofílica, o número de anéis que contém, a presença do metal central na sua estrutura, seu estado de agregação, entre outras. Entretanto, a eficiência do fármaco fotossensibilizador não depende apenas de sua distribuição no tumor, nos tecidos circunvizinhos e nas células malignas e normais, mas também de sua distribuição intracelular (ROSENKRANZ; JANS; SOBOLEV, 2000).

### 1.3 Morfologia do baço

O baço é o maior entre os órgãos linfóides secundários. É altamente eficiente como armadilha para substâncias estranhas presentes na circulação sangüínea e na concentração destas. É o principal órgão do corpo humano no qual anticorpos são sintetizados e a partir do qual são liberados na circulação. O baço é composto de polpa branca, rica em células linfóides, e polpa vermelha, que contém vários seios, assim como grande quantidade de eritrócitos e macrófagos, alguns linfócitos e um menor número de outras células.

As regiões da polpa branca estão localizadas principalmente ao redor de arteríolas menores. As regiões periféricas são ricas em células T com células B presentes principalmente em centros germinativos. Aproximadamente 50% das células do baço são linfócitos B; 30 a 40% são linfócitos T. Após a estimulação antigênica os centros germinativos contêm grande número de células B e plasmócitos as quais sintetizam e secretam anticorpos que são liberados na corrente sangüínea (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

### 1.4 Terapia fotodinâmica e células do sistema imune

As células encontram-se constantemente submetidas a um regime de equilíbrio tissular caracterizado por nascimento, diferenciação, ação e morte celular programada, denominada esta última como apoptose. Este constante ciclo ocorre de forma mais evidente em tecidos de baixa diferenciação como epitélios e células sangüíneas. Nesses casos tornam-se mais importantes os mecanismos que irão determinar se uma célula deverá entrar em processo de divisão ou morte, obedecendo às condições de equilíbrio daquele tecido específico. A maior parte da regulação celular origina-se de sinais oriundos do espaço extracelular, os quais são transmitidos à célula através de fatores de crescimento, que são predominantemente proteínas produzidas em outras células e que irão, de acordo com a necessidade, estabelecer ligações químicas com estruturas contidas ao nível celular. Estes fatores de crescimento desempenham um papel fundamental desde o desenvolvimento do embrião até o controle da proliferação e diferenciação celular (PINHO, 1999).

Visto que, a proliferação celular é uma manifestação básica de todo organismo vivo, uma maior percepção dos fatores que afetam a proliferação celular pode ser

importante em sua aplicação terapêutica, incluindo o uso de drogas ou irradiação laser (KOUTMÁ; JANISCH; VESELSKÁ, 2003).

O processamento e apresentação de antígenos feitos pelas APCs são sinais importantes para a geração de uma resposta imune eficiente (HRYHORENKO *et al.*, 1998). As células T CD4<sup>+</sup> virgens precisam de sinais co-estimulatórios, para iniciar a ativação da proliferação e secreção de várias citocinas; entre elas a IL-2, que é um potente fator de crescimento de células T, que também auxilia na geração de células produtoras de anticorpos, e expande ou ativa células T auxiliares e citotóxicas e ainda as células NK (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

A imunidade anti-tumor depende da presença e da atividade antigênica presente nas células APCs. Essas células são ativadas quando reconhecem componentes liberados por patógenos, e na presença de mediadores pró-inflamatórios. A atividade das APCs estimula a geração de células efetoras a secretarem citocinas. Sendo assim, acredita-se que a TFD possa estimular a produção de mediadores inflamatórios resultando na ativação de APCs capazes de estimular a proliferação de células T efetoras e a secreção de citocinas (GOLLNICK; OWCZARCZAK; MAIER, 2006).

Por outro lado, a intensidade da reação inflamatória entre tecidos normais e cancerígenos poderiam contribuir para seletividade dos danos induzidos pela TFD. Esse processo inflamatório é mediado por fatores, tais como: substâncias vaso ativadoras, componentes do complemento e das cascatas de coagulação, proteinases, peroxidases, citocinas, fatores de crescimento e outros imunoreguladores. Várias citocinas pró-inflamatórias tem sido descritas como moduladoras da TFD. Entre elas podemos citar o TNF- $\alpha$ , a IL-1b, IL-6 e IL-8, as quais são produzidas por neutrófilos e macrófagos que compõem o infiltrado inflamatório ao redor do tumor (CASTANO *et al.*, 2006).

O envolvimento de macrófagos na terapia fotodinâmica tem sido relatado e estudado por Korbelik e *cols* desde 1995 (apud HASAN *et al.*, 2003). Estudos mostraram que macrófagos associados a tumores acumulam até nove vezes os níveis de Photofrin<sup>®</sup> presentes nas células tumorais. Esse aumento na acumulação é atribuído à associação de porfirinas com moléculas de LDL. Em adição, os macrófagos fariam uma liberação de TNF- $\alpha$  que seria capaz de mediar a citotoxicidade por um mecanismo indireto. Estudos feitos por Korbelik e *cols* (1997)

sugerem que a ativação de macrófagos em ratos tratados com a TFD e uma imunoterapia adjuvante tem um efeito sinérgico na cura do tumor. A TFD não somente reduz a carga tumoral, mas também provoca inflamação. Acredita-se que o recrutamento de macrófagos ativados para o local inflamado é o principal fator para uma completa erradicação do tumor.

Os neutrófilos também são células importantes que participam de inflamação e da imunidade. Essas células podem produzir uma variedade de citocinas e quimiocinas importantes para a resposta inflamatória e imunológica (CECIC *et al.*, 2001). A degranulação dos neutrófilos induz a liberação de radicais tóxicos do oxigênio, mieloperoxidase, e enzimas lisossomais causando danos ao tecido afetado com o tumor. Essas células também prolongam os danos letais durante esses eventos, liberando substâncias quimiotáticas que irão atrair uma nova onda de invasão de células do sistema imunológico (DOUGHERTY *et al.*, 1998). Em 1996, Wil de Vree e cols relataram que a TFD ativou a acumulação dos neutrófilos, e retardou o crescimento do tumor e que a depleção dessas células nos tumores em desenvolvimento diminuiu o efeito mediado pela TFD no tumor crescido (apud DOLMANS *et al.*, 2003).

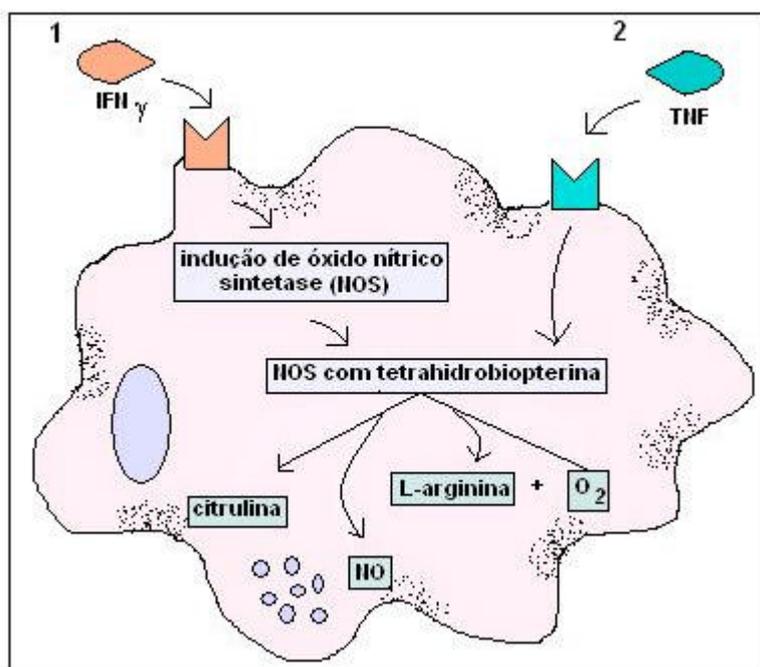
Recentemente, pesquisadores mostraram que a resposta inflamatória, que contribui substancialmente para o controle no local do tumor, é dominada por neutrófilos. Possivelmente essas células participam da geração da imunidade anti-tumor após TFD e talvez estimulem a proliferação de células T (KOUSIS *et al.*, 2007).

### 1.5 Terapia fotodinâmica e Óxido nítrico

O óxido nítrico gerou uma quantidade exponencial de pesquisa desde sua identificação em 1987. Durante a última década esta pequena molécula emergiu como um mediador importante no processo fisiológico e patológico (ALEXANDROVA; MILEVA; ZVETKOVA, 2001). O NO é uma importante molécula de sinalização que induz uma variedade de fenômenos, como: relaxamento vascular dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal, entre outras (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A produção do óxido nítrico pode ser derivada de uma variedade de células, tais como: células endoteliais, células do músculo liso, macrófagos, fibroblastos e células tumorais. Conseqüentemente, o NO pode modular amplamente o espectro das atividades fisiológicas, funções vasculares (forma vascular, permeabilidade e interação endotelial de leucócitos) e, além disso, a inflamação, a resposta imunológica, entre outras (HENDERSON; SITNIK-BUSCH; VAUGHAN, 1999). Como a meia-vida *in vivo* do NO é apenas uma questão de segundos, o gás atua somente em células da vizinhança estreita de onde ele é produzido (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

No sistema imunológico, o óxido nítrico é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos (figura 2) e outras células do sistema imune, que expressam a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). O NO gerado nestas circunstâncias ocasiona “danos oxidativos” letais às células-alvo, tais como em células cancerosas ou infectadas (BARRETO *et al.*, 2005). A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2) e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Este por sua vez, produz grande quantidade de NO que atua em parasitas e células tumorais. A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).



**Figura 2: A produção do óxido nítrico em macrófagos. A ativação da óxido nítrico sintase (iNOS) combina o oxigênio com o nitrogênio guanidino da L-arginina resultando na produção do óxido nítrico, que é tóxico para as bactérias e células tumorais. (1) processo ativado por**

**IFN-g em macrófago , (2) e desencadeado por TNF-a (figura adaptada de ROITT; BROSTOFF; MALE, 2001).**

A atividade do NO foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal e miocárdio. O NO também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). E está envolvido na origem da desordem de muitas doenças, incluindo câncer, metástase e apoptose (GUPTA; AHMAD; MUKHTAR, 1998).

Em tumores humanos o papel do NO não foi totalmente esclarecido. O NO produz múltiplos efeitos que podem influenciar no resultado do crescimento tumoral e metástase (ALEXANDROVA; MILEVA; ZVETKOVA, 2001).

O papel do óxido nítrico no câncer é multidimensional, portanto, seus efeitos podem ser determinados através de sua localização e concentração no tecido. (WINK *et al.*, 1998). Entretanto, a atividade anti-tumoral do NO depende da quantidade de NO gerado e da interação das células do hospedeiro com as do tumor. Esta interação pode gerar efeito ora estimulante ora inibitório na imunidade anti-tumoral (ALEXANDROVA; MILEVA; ZVETKOVA, 2001).

Baseado nos resultados apresentados, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da TFD na capacidade proliferativa de células imunológicas assim como a produção de mediadores importantes na resposta imune celular.

## 2 OBJETIVOS

- Investigar os efeitos da Terapia Fotodinâmica na resposta imune celular mediada por esplenócitos murinos através do tratamento de camundongos com ftalocianina de silício (NzPc) e irradiação com laser na região do baço, na ausência de tumor. Esses efeitos foram estudados através da:
  - Medida da proliferação celular em resposta ao estímulo *in vitro* com a lectina Concanavalina-A.
  - 1.2 Medida da produção de óxido nítrico espontânea ou estimulada por Concanavalina-A.
  - Observação do perfil histológico dos animais tratados ou não com TFD.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e soluções

Fármaco fotossensibilizador: o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc),  $C_{44}H_{46}I_2N_{10}O_2Si$ , proposto para este estudo foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica, IP&D - UNIVAP.

O fármaco fotossensibilizador, após diluição em PBS, foi protegido da luz e a solução estocada a 4°C numa concentração de 0,05 mg/mL.

Meio de cultura: Foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina (Gibco™, Invitrogen Corporation). O conteúdo de cada frasco foi reconstituído em 1 litro de água ultra pura e adicionado bicarbonato de sódio (JTBaker™), HEPES 10 mM (N-2 hidroxietilpiperazina, N2 ácido etanosulfônico) (Sigma®) e  $5 \times 10^{-5}M$  2-mercaptoetanol (Sigma®). O pH da solução foi ajustado para 7,1 e foi denominado de RPMI incompleto. O meio usado nas culturas foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™, Invitrogen Corp.), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco™, Invitrogen Corp.), e foi denominado de RPMI completo. A solução foi filtrada com membrana de poro 0,22 µm e conservada a 4°C.

Solução de Lise: Foram misturadas 9 partes de uma solução de cloreto de amônio 0,16M e 1 parte de solução de Tris 0,17M. A solução filtrada com membrana de poro 0,22 µm e mantida a 4°C.

Solução salina tamponada (PBS): 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 13,82 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 2 g de  $KH_2PO_4$  (Merck) num volume final de 1000 mL de água destilada. A solução foi filtrada com membrana de poro 0,22 µm e conservada a 4°C.

MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico: para o ensaio de proliferação celular, foi utilizado o método colorimétrico de MTT (Sigma®) (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003). Concentração final igual a 5 mg/mL.

Reagente de Griess: Para o ensaio de dosagem de óxido nítrico foi utilizado o reagente de Griess (Acros Organics) (GREEN; TANNENBAUM, 1982).

Solução de formol a 10% (Vetec): Fixação e armazenamento dos tecidos para histologia.

Corantes utilizados na histologia: As lâminas foram coradas com hematoxilina (Allkimia<sup>®</sup>) e eosina (Nuclear) - HE.

### 3.2 Animais de Experimentação

Foram utilizados 40 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c do sexo masculino, com 8 a 12 semanas de vida. Os animais foram condicionados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II (IP&D II) com o consentimento do Prof Dr. Wellington Ribeiro. Os animais foram alojados em caixas forradas com maravalha contendo 3 animais/caixa, mantidos a temperatura ambiente com exaustão de ar, com livre acesso à água e à ração para camundongos e ritmo normal de dia-noite.

Devido à utilização de animais o trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univap sob o protocolo nº A080/CEP/2007.

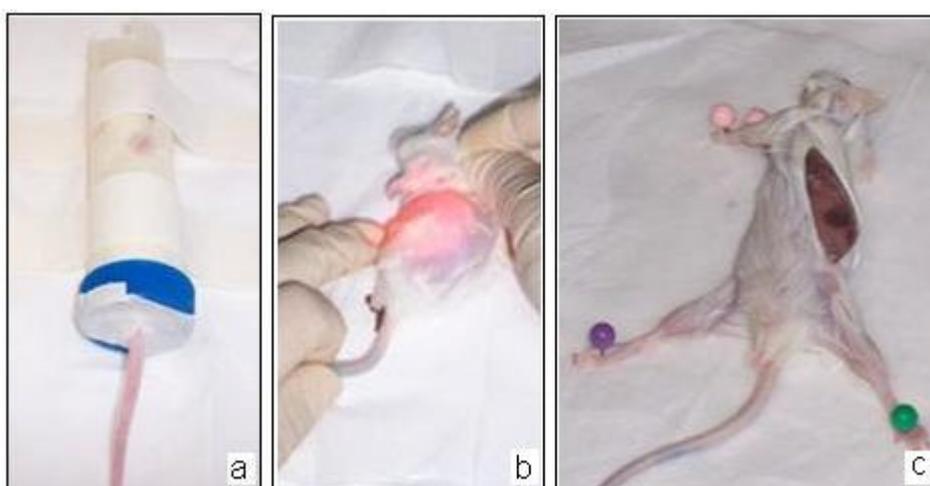
Esses animais foram divididos em 4 grupos:

- grupo controle, animais sem nenhum tratamento;
- grupo laser, animais irradiados somente com laser por 4 minutos e 46 segundos (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $50 \text{ mW/cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada;
- grupo Pc, animais tratados apenas com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) (concentração  $0,5 \mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo);
- grupo TFD, animais tratados com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) (concentração  $0,5 \mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) e irradiados por 4 minutos e 46 segundos com laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $50 \text{ mW/cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada.

### 3.3 Administração do Fármaco Fotossensibilizador

A Ftalocianina foi dissolvida em PBS e injetada por via endovenosa (veia da cauda) na dose de  $0,5 \mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo. Após 1 hora os animais foram contidos e tricotomizados e em seguida, irradiados por 4 minutos e 46 segundos com luz laser na região do baço (thera lase<sup>®</sup>) com  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada. Foram feitos grupos controle paralelamente.

### 3.4 Coleta das Amostras



**Figura 3: Procedimentos para a realização do experimento.** a) contenção do animal para a aplicação endovenosa do fármaco fotossensibilizador ( $0,5 \mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo); b) irradiação do laser na região do baço; c) remoção cirúrgica do baço.

Inicialmente os animais foram contidos em um tubo cilíndrico, devidamente preparado, para facilitar a exposição da cauda e a administração endovenosa do fármaco fotossensibilizador no local. Após 1 hora foi realizada a tricotomia na região do baço e em seguida, a região foi irradiada com o laser (thera lase<sup>®</sup>) por 4 minutos e 46 segundos com área de irradiação de  $1 \text{ cm}^2$ . Os animais ( $n=3$ ) foram pré-anestesiados (zoletil -  $50 \text{ mg}/\text{Kg}$ ), com uma injeção intramuscular, e então sacrificados em diferentes tempos: 4, 8, 12, 24 ou 48 horas após a irradiação. O baço de cada animal foi retirado, colocado em uma placa de Petri (Bioplass) com RPMI completo e macerado cuidadosamente para a obtenção das células. Os esplenócitos foram lavados com meio RPMI, centrifugadas por 1000 rpm 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . A seguir as hemácias foram lisadas com solução de lise, centrifugadas novamente, e os esplenócitos foram ressuspensos em RPMI-C, contados em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  células/mL em RPMI

completo. As células foram então distribuídas em placas de 96 poços (200 µL/poço). Os esplenócitos foram incubados por 48 horas com meio somente ou na presença da lectina concanavalina A (Con-A) a 5 µg/mL, a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Electron Corporation - Modelo 3110). Passado esse período, foram efetuados os ensaios de MTT para medida da proliferação celular e a dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess (GREEN; TANNENBAUM, 1982). Ambos os ensaios tiveram a densidade ótica (D.O.) determinada por meio de um leitor de microplacas (ELISA) (Biotec®). Paralelamente, foram feitos animais controles.

### 3.5 Proliferação e Viabilidade Celular

Após o período de incubação das células, 48 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, foram retirados 100 µL do meio e adicionados 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) e 80 µL de meio RPMI completo. A placa foi protegida da luz e incubada por 12 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação adicionou-se em cada poço 100 µL da solução de SDS (Merck) a 10%, após essa etapa a placa agitada levemente em um agitador de placas (Phoenix) por 1 hora e incubada por mais 12 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a placa foi novamente agitada por mais 1 hora e sua leitura realizada no equipamento ELISA (Biotec®) ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ). Os dados obtidos foram tratados de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{(\text{Absorbância de Células Tratadas} - \text{Absorbância do Branco})}{(\text{Absorbância de Células Controle} - \text{Absorbância do Branco})} \times 100$$

Onde o branco é representado pela absorbância do poço vazio.

### 3.6 Dosagem de NO

A dosagem da concentração de NO nos sobrenadantes, recolhidos após 24 e 48 horas foi realizada em placas de 96 poços, adicionando-se 100 µL da amostra e 100 µL do reagente de Griess, as amostras ficaram à temperatura ambiente por 10

minutos e em seguida, a absorbância (540 nm) determinada em leitor de ELISA (Biotec<sup>®</sup>). Os resultados obtidos em  $\mu\text{M}$  foram determinados a partir de uma curva padrão realizada com nitrato de sódio (Vetec) em concentrações de 200 a 3,125  $\mu\text{M}$ . As dosagens e a curva padrão foram feitas em triplicata.

### 3.7 Análise Estatística

Foram utilizados o programa de computador Origin 7.0 e sua ferramenta ANOVA 2way. Valores com  $P=0,05$  foram considerados significativos (\*)

### 3.8 Cortes Histológicos

Após a esplenectomia, um fragmento do baço foi retirado e armazenado em frascos contendo solução de formol a 10%. Os tecidos foram encaminhados ao laboratório CIPAX medicina diagnóstica (São José dos Campos – SP), e processados em um processador de tecidos Autotechnicon 2A (IMEB International Medical Equipment, inc. EUA) correspondente aos passos de fixação, desidratação e diafanização de tecidos. Em seguida, fez-se a inclusão do material em parafina e os cortes histológicos (3 micrômetros) foram realizados em um micrótomo American Optical 820 (Global Medical Instrumentation, inc. EUA). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

### 3.9 Análise Histológica

As lâminas foram examinadas morfológicamente e fotografadas em um microscópio óptico (Leica DM 2500), utilizando uma objetiva de 10x, acoplado a câmera fotográfica (Leica DFC 290) utilizando-se os programas: Leica câmera software, Leica QWin e Leica Server CD<sup>®</sup>.

## 4 RESULTADOS

Foram utilizados esplenócitos de camundongos BALB/c (n=3) machos com 8 a 12 semanas de vida, para os ensaios de proliferação celular, dosagem de NO nos sobrenadantes das culturas e análise histológica do baço dos animais submetidos à TFD ou não, divididos como segue (veja Materiais e Métodos):

- grupo controle;
- grupo laser;
- grupo Pc;
- grupo TFD.

Os esplenócitos obtidos ( $5 \times 10^6$  céls/mL) foram distribuídos em triplicata em placas de 96 poços e após 48 horas de incubação a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub> foram submetidos aos ensaios de MTT e dosagem de NO nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos.

### 4.1 Proliferação celular

Vide abaixo a figura 4, que mostra a medida de proliferação celular em esplenócitos de animais submetidos ou não a TFD.

#### 4.1.1 Grupo Controle

A resposta proliferativa dos esplenócitos foi medida pelo ensaio colorimétrico de MTT. Os esplenócitos obtidos após o sacrifício dos animais foram incubados na ausência ou presença de 5 µg/mL de concanavalina A (Con-A), uma lectina isolada da planta *Canavalia ensiformis*, que se liga a manose da membrana de linfócitos sinalizando a proliferação (PERES; CURI, 2005).

Os esplenócitos analisados são de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento e/ou estímulo. Nossos resultados mostram, como esperado, que os esplenócitos apresentaram uma resposta proliferativa acentuada na presença da Con-A (cerca de 4 vezes) em comparação com as células na ausência da lectina.

#### 4.1.2 Grupo Laser

Os animais desse grupo foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço e, em seguida, os esplenócitos foram obtidos e incubados por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os resultados mostram que os esplenócitos desses animais apresentaram uma resposta proliferativa significativamente acentuada (cerca de 3 vezes,  $P<0,001$ ) em comparação com as células (controle) na ausência da lectina. Esplenócitos cultivados na presença de Con-A apresentaram uma resposta proliferativa menor (decréscimo de 20%) em comparação com as células do controle quando incubadas com a lectina.

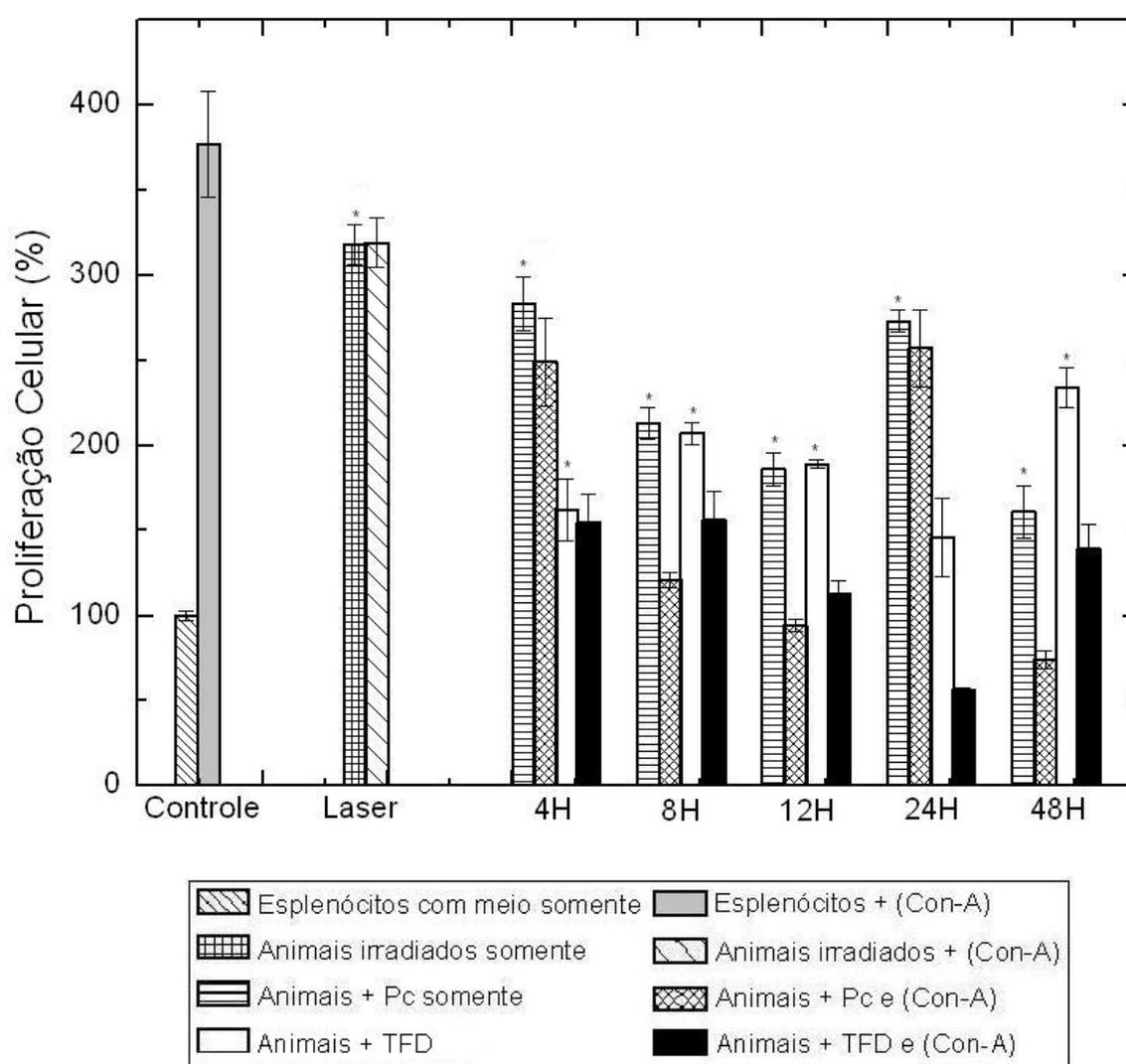
#### 4.1.3 Grupo Pc

Esses animais foram tratados apenas com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5\ \mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo). Os animais foram sacrificados em diferentes tempos: 4, 8, 12, 24 ou 48 horas após a injeção da NzPc na veia da cauda. Ao analisarmos os resultados, observamos que a resposta proliferativa foi mais acentuada nos esplenócitos de 4 e 24 horas ( $P<0,001$ ) após a injeção de NzPc (cerca de 3 vezes), comparando-se com esplenócitos do controle. Os demais animais de 8, 12 e 48 horas (após a injeção) também apresentaram significativo aumento na resposta proliferativa ( $P<0,001$ ) para 8 e 12 horas e ( $P<0,01$ ) para 48 horas, entretanto os esplenócitos obtidos após 48 horas da injeção de NzPc, apresentaram resposta proliferativa menos intensa. As amostras de 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a injeção de NzPc, cujos esplenócitos foram cultivados na presença de Con-A apresentaram resposta proliferativa sempre significativamente menor ( $P<0,001$ ) em relação aos esplenócitos do controle cultivados com a lectina.

#### 4.1.4 Grupo TFD

Os animais desse grupo foram tratados com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5\ \mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) e após 1 hora tiveram a região do baço irradiada por 4 minutos e 46 segundos com laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada. Os animais

foram então sacrificados após 4, 8, 12, 24 ou 48 horas, os esplenócitos foram obtidos e cultivados na ausência ou presença de Con-A. Verificamos que a resposta proliferativa dos esplenócitos, na ausência de Con-A, foi maior em comparação com os esplenócitos do controle (sem Con-A) ( $P < 0,001$ ) em todos os tempos analisados, entretanto, aqueles animais sacrificados após 48 horas da TFD, apresentaram uma proliferação mais evidente (cerca de duas vezes em relação ao controle,  $P < 0,001$ ). Quando analisamos a proliferação celular de esplenócitos cultivados na presença da lectina, para as amostras dos animais sacrificados após 4, 8, 12, 24 ou 48 horas, observamos que a resposta proliferativa nesses casos foi significativamente menor ( $P < 0,001$ ) em comparação com o controle (esplenócitos + Con-A).



**Figura 4: Medida de proliferação celular em esplenócitos de animais submetidos ou não a TFD. Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na veia da cauda Ftalocianina de silício - NzPc (0,5 mM/Kg de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>ã</sup>)  $\lambda = 685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na**

**presença e/ou ausência da Con-A por 48 horas. A seguir, as células foram submetidas ao ensaio de MTT e a absorbância determinada em 540 nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na presença ou ausência de Con-A por 48 horas.**

(\*) **significante para  $P=0,05$ .**

## 4.2 Dosagem de óxido nítrico

### 4.2.1 Na ausência de Con-A

Os esplenócitos obtidos ( $5 \times 10^6$  céls/mL) foram distribuídos em triplicata em orifícios de placas de cultura de 96 poços e após 24 e 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , os sobrenadantes foram recolhidos para a realização da dosagem de NO, através do reagente Griess (GREEN; TANNENBAUM, 1982) (figura 5).

#### 4.2.1.1 Grupo controle

Os esplenócitos analisados desse grupo são de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os resultados obtidos mostram uma maior produção de NO, na ausência da Con-A, após 24 horas de incubação. Com 48 horas de incubação a produção de NO diminuiu.

#### 4.2.1.2 Grupo laser

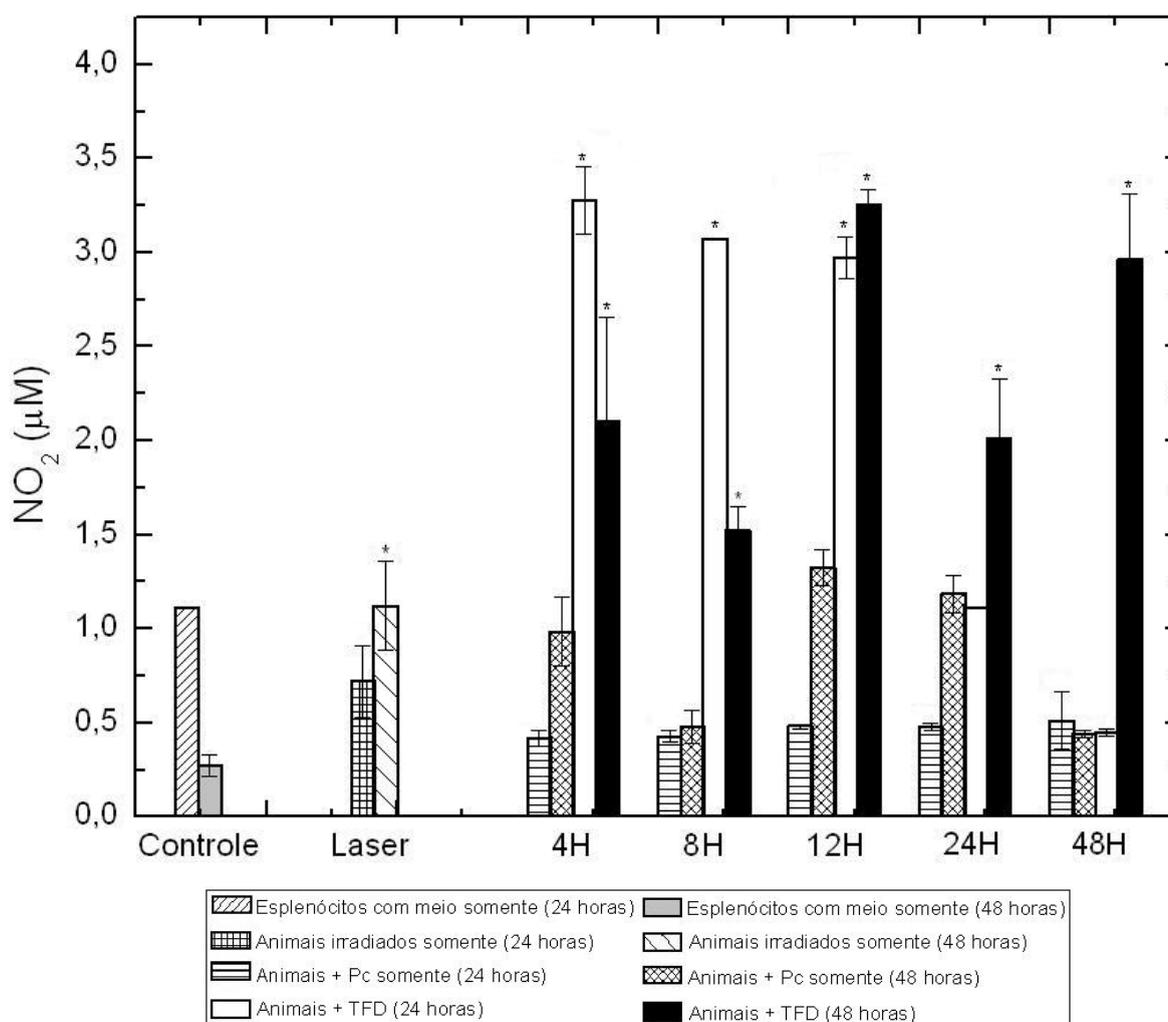
Os animais desse grupo foram estimulados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $50 \text{ mW/cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço e em seguida, os esplenócitos foram obtidos e incubados por 24 e 48 horas e a produção de NO quantificada pelo método de Griess (GREEN; TANNENBAUM, 1982). Nossos resultados indicam que na ausência da Con-A, a produção de NO foi mais elevada nos sobrenadantes analisados após 48 horas de incubação (~ 4 vezes,  $P<0,01$ ). Com 24 horas de incubação os sobrenadantes apresentaram uma produção de NO um pouco menor em comparação com o controle.

#### 4.2.1.3 Grupo Pc

Esses animais receberam somente o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) (0,5  $\mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e incubados na ausência da Con-A por 24 e 48 horas. Nossos resultados mostram que a produção de NO (figura 5) foi mais elevada nos sobrenadantes, após 48 horas de incubação, das amostras de 4 e 24 horas com pico na produção NO nas amostras de 12 horas ( $P < 0,001$ ). Os sobrenadantes das amostras em todos os tempos (4, 8, 12, 24 e 48 horas) após 24 horas de incubação, apresentaram uma produção de NO significativamente menor em relação ao controle ( $P < 0,001$ ).

#### 4.2.1.4 Grupo TFD

Os animais desse grupo foram tratados com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) (0,5  $\mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda e após 1 hora, foram irradiados com o laser por 4 minutos e 46 segundos (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda = 685\text{nm}$ , dose da luz – 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  e 1  $\text{cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Prosseguindo, após 4, 8, 12, 24 e 48 horas da TFD os esplenócitos foram obtidos e incubados na ausência da Con-A por 24 e 48 horas. Analisando os resultados (figura 5), verificamos que nos sobrenadantes após 24 horas de incubação, a produção de NO das amostras 4, 8 e 12 horas após TFD foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ), cerca de 3 vezes, em relação ao controle. Nas amostras de 24 e 48 horas após TFD a produção de NO foi decrescente, sugerindo um decaimento na produção de NO com o passar do tempo. Ao analisarmos os sobrenadantes com 48 horas de incubação, a produção de NO foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) em todas as amostras (4, 8, 12, 24 e 48 horas após TFD) com pico na produção de NO nas amostras após 12 horas de TFD.



**Figura 5:: Dosagem de óxido nítrico na ausência de concanavalina A (Con-A). Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na região da cauda Ftalocianina de silício – NzPc (0,5 mM/Kg de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na ausência da Con-A por 24 e 48 horas. A seguir as células foram submetidas à dosagem de óxido nítrico através do reagente Griess e a absorbância determinada em 540 nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na ausência de Con-A por 24 e 48 horas.**

(\*) significante para  $P=0,05$ .

#### 4.2.2 Na presença de Con-A

Os esplenócitos obtidos ( $5 \times 10^6$  céls/mL) foram distribuídos em triplicata em orifícios de placas de cultura de 96 poços e após 24 e 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa úmida e 5% de  $\text{CO}_2$ , os sobrenadantes, na presença da Con-A, foram recolhidos para a realização da dosagem de NO, através do reagente Griess (GREEN; TANNENBAUM, 1982) (figura 6).

#### 4.2.2.1 Grupo controle

Os esplenócitos analisados desse grupo são de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. Os resultados obtidos mostram uma maior produção de NO, na presença da Con-A, após 24 horas de incubação. Com 48 horas de incubação a produção de NO foi um pouco menor.

#### 4.2.2.2 Grupo laser

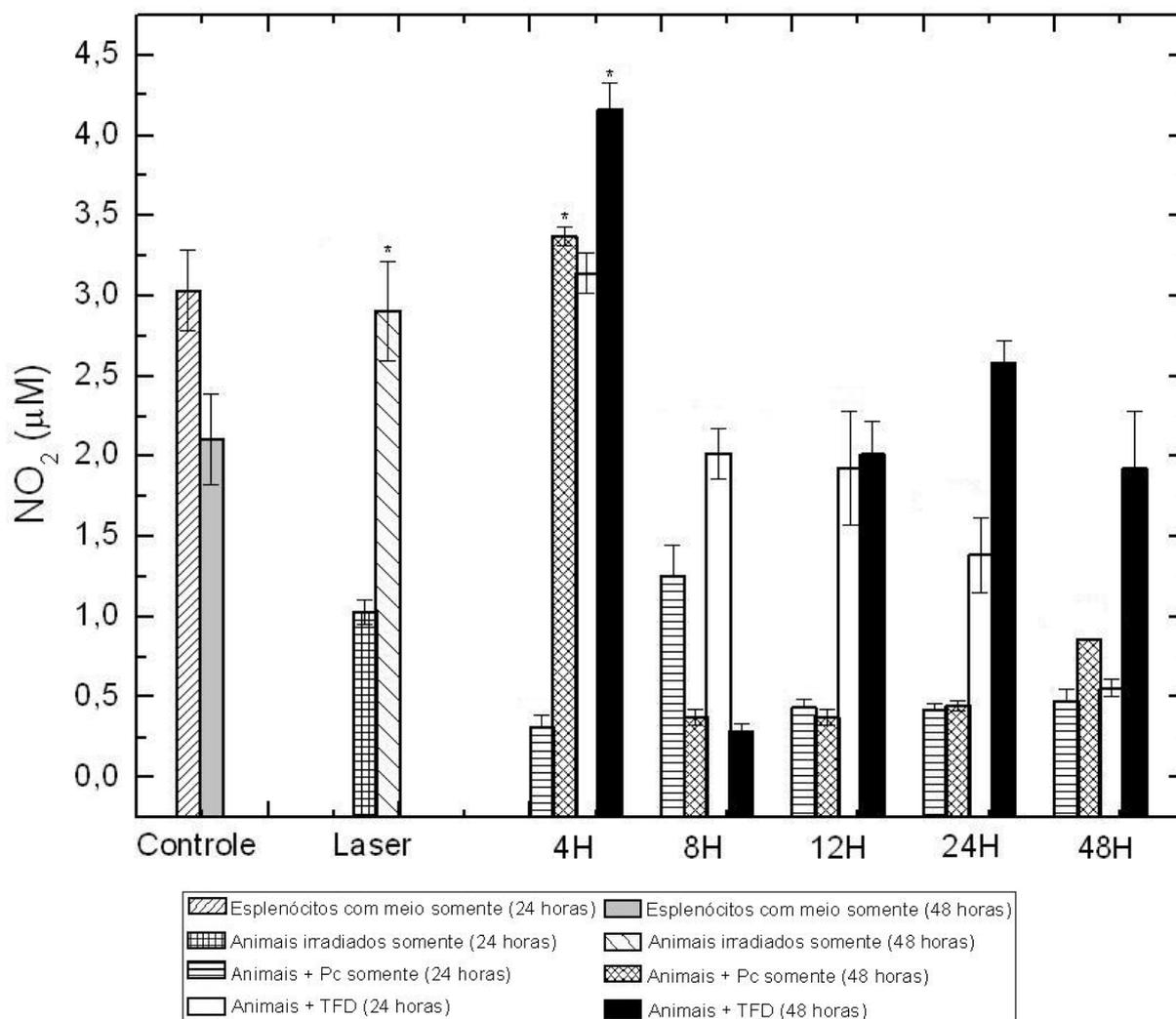
Os animais desse grupo foram estimulados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço e em seguida, os esplenócitos foram obtidos e incubados por 24 e 48 horas e a produção de NO quantificada na presença da Con-A. Nossos resultados indicam que a produção de NO foi mais elevada ( $P<0,001$ ) nos sobrenadantes após 48 horas de incubação. Porém, com 24 horas de incubação os sobrenadantes apresentaram uma produção de NO bem menor.

#### 4.2.2.3 Grupo Pc

Esses animais receberam o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5\ \mu\text{M/Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e incubados na presença da Con-A por 24 e 48 horas. Os sobrenadantes analisados após 48 horas de incubação e na presença da Con-A (figura 6), indicam um significativo aumento ( $P<0,001$ ) na produção de NO para as amostras de 4 horas após a injeção da Pc. Também podemos observar que com o passar do tempo (amostras 8, 12, 24 e 48 horas) a produção de NO diminuiu significativamente ( $P<0,05$ ) em relação ao controle. Nos sobrenadantes com 24 horas de incubação e na presença da Con-A a produção de NO se manteve sempre menor em relação ao controle (cerca de 5 vezes) em todas as amostras ( $P<0,001$ ).

#### 4.2.2.4 Grupo TFD

Os animais desse grupo foram tratados com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5 \mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda e após 1 hora, foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Em seguida, nos tempos 4, 8, 12, 24 e 48 horas após TFD os esplenócitos foram obtidos e incubados na presença da Con-A por 24 e 48 horas. Os sobrenadantes analisados após 48 horas de incubação e na presença da Con-A, mostram um pico na produção de NO nas amostras de 4 horas após TFD em relação ao controle; nas demais amostras (8, 12, 24 e 48 horas) a produção de NO foi menor em relação ao controle, com queda brusca em 8 horas e pequena elevação a partir de 12 horas (não significativa em relação ao controle). Nos sobrenadantes com 24 horas de incubação e na presença da Con-A a produção de NO da amostra de 4 horas foi equivalente a do controle. Nas demais amostras (8, 12, 24 e 48 horas após TFD) a produção de NO foi significativamente menor ( $P<0,001$ ) que do controle.



**Figura 6: Dosagem de óxido nítrico na presença da concanavalina A (Con-A). Camundongos BALB/c receberam endovenosamente na região da cauda Ftalocianina de silício – NzPc (0,5 mM/Kg de peso corpóreo) e foram irradiados por 4 minutos e 46 segundos com o laser (teralase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Após 4, 8, 12, 24 e 48 horas os esplenócitos foram obtidos e cultivados na presença da Con-A por 24 e 48 horas. A seguir as células foram submetidas à dosagem de óxido nítrico através do reagente Griess e a absorbância determinada em 540nm. Esplenócitos de animais controle (sem tratamento algum), ou que foram somente irradiados ou ainda que receberam somente Ftalocianina de silício também foram cultivados na presença de Con-A por 24 e 48 horas.**

(\*) significativa para  $P=0,05$ .

### 4.3 Histologia

Macroscopicamente, o baço apresenta duas regiões distintas: uma formada por tecido muito mole, com cor vermelha escura, que recebe o nome de polpa vermelha. Disseminada pela polpa vermelha, vêm-se pequenos pontos acinzentados ou ligeiramente amarelados, que no conjunto constituem a polpa branca (GLEREAN, 2002).

Em um corte histológico corado observamos uma cápsula que envia septos (trabéculas) para o interior do órgão. Entre os septos existe a presença de nódulos linfáticos, chamados corpúsculos esplênicos ou de Malpighi e que pertencem à polpa branca. Caracteristicamente esses nódulos possuem no seu interior uma arteríola. Não existe uma nítida divisão entre regiões medular e cortical, pois os nódulos não têm a tendência de se dispor na periferia do órgão, ao contrário do que acontece com os linfonodos. Constituindo o arcabouço de sustentação, por todo o órgão existe uma malha tridimensional de fibras reticulares e de células reticulares (GLEREAN, 2002).

#### 4.3.1 Grupo controle

Foram analisados o baço de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento e/ou estímulo. Esses apresentaram polpa branca e polpa vermelha sem qualquer alteração (figuras 7, 8 e 9).

#### 4.3.2 Grupo laser

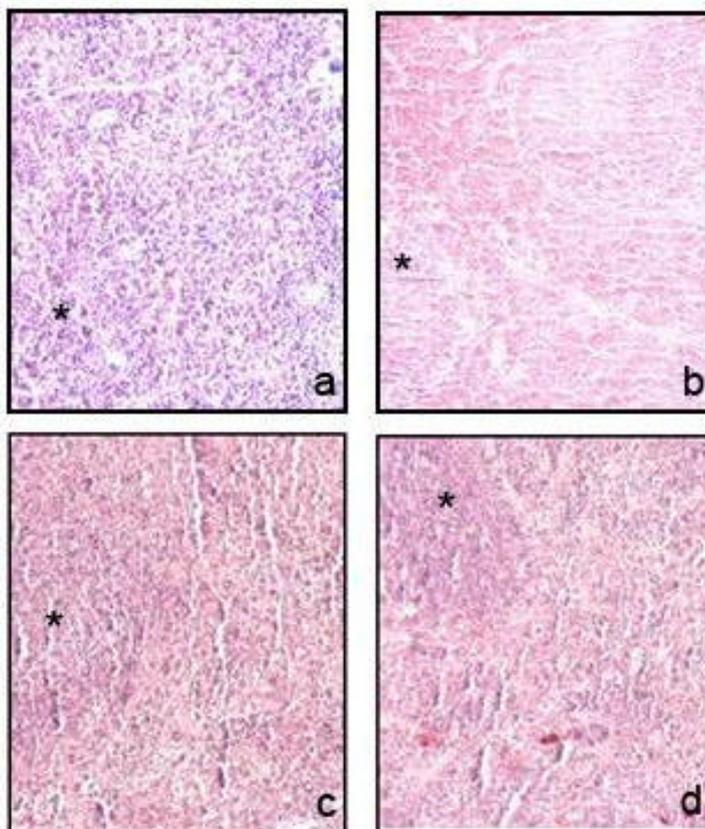
Os animais desse grupo foram irradiados com o laser por 4 minutos e 46 segundos (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ mW/cm}^2$  e  $1\text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço e em seguida foi feita a esplenectomia. A polpa branca, nesse caso, não aparece muito evidente (figuras 7, 8 e 9).

#### 4.3.3 Grupo Pc

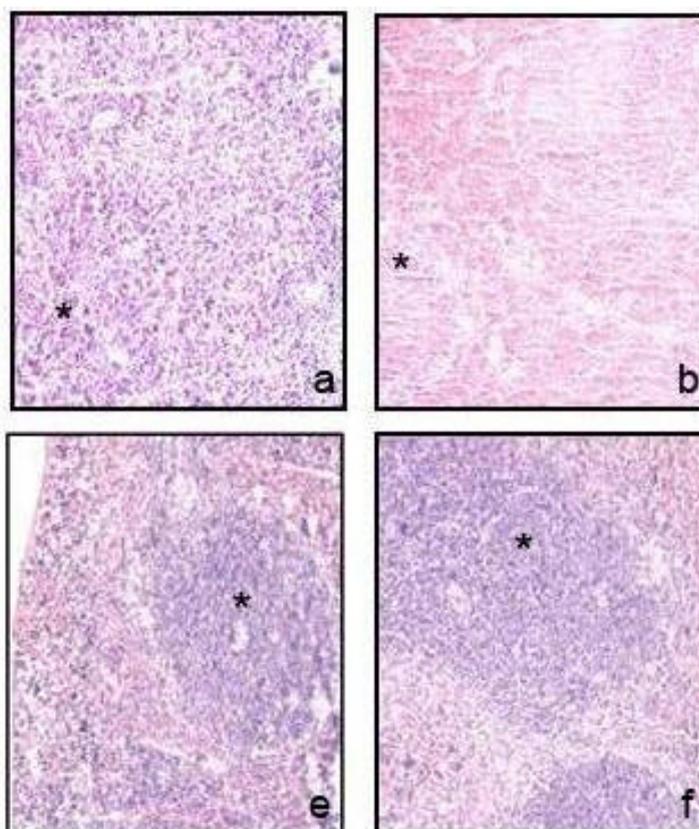
Esses animais receberam somente o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5 \mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda. Após 12, 24 e 48 horas o baço dos animais foram retirados. Nossos resultados sugerem que há uma maior evidência da polpa branca na amostra após 24 horas da injeção da Pc (figura 8), quando comparamos com as amostras de 12 horas (figura 7) e 48 horas (figura 9).

#### 4.3.4 Grupo TFD

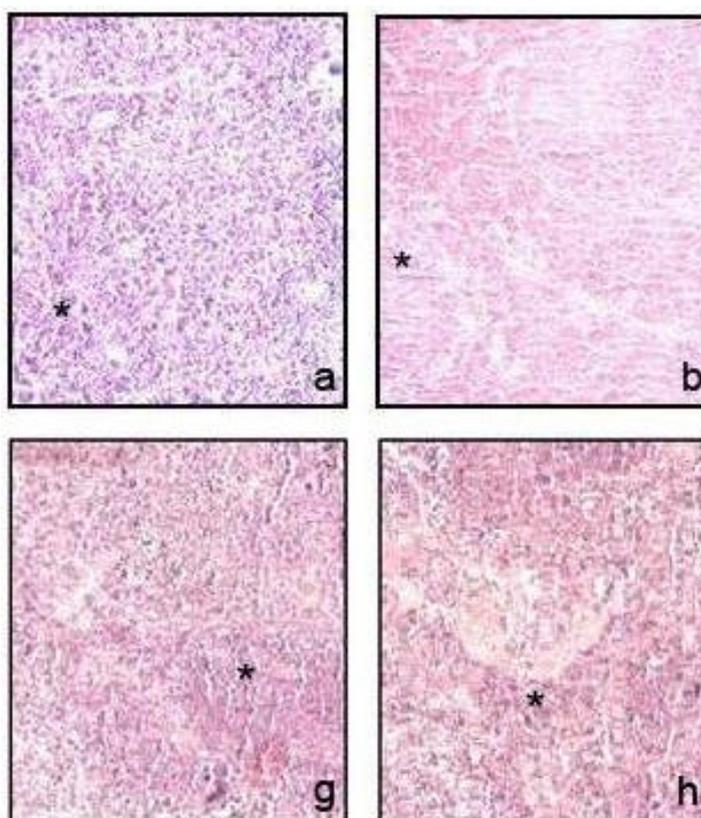
Os animais desse grupo foram tratados com o fármaco fotossensibilizador (Ftalocianina de silício - NzPc) ( $0,5 \mu\text{M}/\text{Kg}$  de peso corpóreo) na veia da cauda e após 1 hora, foram irradiados com o laser por 4 minutos e 46 segundos (thera lase<sup>®</sup>)  $\lambda=685\text{nm}$ , dose da luz –  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,  $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$  e  $1 \text{ cm}^2$  de área irradiada na região do baço. Em seguida, nos tempos 12, 24 e 48 horas o baço dos animais foram retirados. Nossos resultados sugerem uma maior evidência da polpa branca na amostra de 24 horas após TFD (figura 8), quando comparamos com as amostras de 12 horas (figura 7) e 48 horas (figura 9).



**Figura 7:** Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 12 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; c) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 12 horas da administração da Ftalocianina – NzPc e d) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a Ftalocianina – NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 12 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE.



**Figura 8:** Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 24 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; e) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 24 horas da administração da Ftalocianina - NzPc e f) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a Ftalocianina - NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 24 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE.



**Figura 9:** Análise morfológica do baço de animais tratados ou não com TFD após 48 horas. a) animal controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento; b) animal irradiado somente na região do baço; g) animal tratado com Pc somente, esplenectomia realizada após 48 horas da administração da Ftalocianina – NzPc e h) animal tratado com TFD, esse animal foi tratado inicialmente com a Ftalocianina – NzPc e após 1 hora foi irradiado com laser na região do baço, a esplenectomia foi realizada após 48 horas. (\*) polpa branca. Aumento original de 100x; HE.

## 5 DISCUSSÃO

O modelo experimental proposto e apresentado nesse trabalho é relevante em alguns aspectos imunológicos como: capacidade proliferativa dos esplenócitos de animais tratados ou não com TFD, assim como a produção do gás citotóxico óxido nítrico. As principais considerações são apresentadas a seguir:

### Proliferação celular

Os esplenócitos obtidos ( $5 \times 10^6$  céls/mL), para o ensaio de proliferação celular, foram cultivados na presença e/ou ausência de Con-A. A proliferação celular foi medida através do ensaio colorimétrico de MTT, um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazan, produto da redução do tetrazolium MTT. A redução do MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida da função mitocondrial, e uma vez que esta redução somente ocorre em células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas no experimento (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003).

Ao iniciarmos os ensaios de MTT e medir a proliferação celular observamos que estes ficaram aquém do esperado e que não refletiam o que era observado ao microscópio. Assim, na tentativa de adequar o ensaio, outros protocolos descritos na literatura foram testados. Uma outra dificuldade eram os animais, os quais foram adquiridos fora da Universidade, sendo assim, não tínhamos como atestar as reais condições que esses animais se encontravam quando chegaram até nós e muitas repetições, principalmente dos controles foram feitas.

Os resultados apresentados (figura 4) mostram que o laser (thera lase<sup>®</sup>) de baixa potência interferiu positivamente na resposta proliferativa do animal.

Segundo Novoselova e cols (2006) a dinâmica da resposta imune frente a lasers de baixa potência é dependente de 2 fatores: a dose acumulativa e o tipo de superfície irradiada. Dentre os diversos tipos celulares, cada uma demonstra diferente grau de sensibilidade à radiação laser, sendo as células T as mais responsivas. O laser de baixa potência é capaz de induzir atividade das células

imunológicas se o tempo de exposição não exceder 10 dias, ao passo que tratamentos em períodos mais prolongados podem induzir mudanças severas incluindo a imunossupressão. Esses efeitos se estenderiam a produção de citocinas como a IL-2 e a produção de NO.

A ativação de células T é induzida através da apresentação de antígeno por meio de células (APCs), macrófagos/monócitos e células dendríticas. A natureza da APC e do antígeno irão determinar que tipo de célula T (Th1, Th2 ou células T regulatórias) predominará e se as células T ativadas migrarão para o local da inflamação (KEMPER; ATKINSON, 2007). A célula T tem um papel importante na imunidade adquirida, pois secreta citocinas que auxiliam na resposta imunológica contra antígenos (BILLADEAU; NOLZ; GOMEZ, 2007) e induzem a migração de células imunes para o local da infecção (ALCANI, 2003). As interações APC-células T nas quais os sinais co-estimulatórios ou secundários se mostrem bloqueados ou ausentes tendem a induzir a tolerância em vez de ativar a célula T (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002)

Paralelamente o fármaco fotossensibilizador (NzPc) também induziu um aumento na resposta proliferativa (figura 4) já no período de 4 horas após TFD. Também podemos perceber que a NzPc não foi por si só tóxica para as células, uma característica importante e necessária para os fotossensibilizadores (RÉ *et al.*, 2006). Provavelmente a NzPc atuou como um antígeno para os esplenócitos, visto que essas drogas ao serem introduzidas em algum organismo vivo são capazes de se conjugar a proteínas endógenas para serem carregadas e distribuídas pelo organismo (VAZQUEZ *et al.*, 2007). Na sua forma nativa, os fotossensibilizadores são considerados haptenos, esses falham na indução de uma resposta imune devido ao seu peso molecular baixo e à sua simplicidade química. Haptenos tornam-se imunogênicos somente quando conjugados com carreadores de peso molecular alto e de estrutura físico-química complexa (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

A resposta proliferativa dos esplenócitos de animais submetidos à TFD não foi tão evidente, possivelmente pela indução de morte de esplenócitos submetidos à TFD ou ainda pela liberação de citocinas que propiciam uma diminuição da resposta proliferativa inicialmente. Além disso, alguns receptores para citocinas poderiam estar sendo modulados acarretando conseqüentemente uma diminuição de proliferação celular. Após 48 horas a resposta proliferativa do animal, submetido à

TFD, foi um pouco mais evidente quando comparado com as demais amostras. Mostrando um possível restauro na resposta proliferativa do animal.

Paradoxalmente, considerando as discussões existentes sobre a TFD e o sistema imunológico, relatos indicam que a TFD pode induzir de diversas formas, um estado de imunossupressão. Pesquisas apontam que a imunossupressão está ligada a reação de hipersensibilidade de contato. A hipersensibilidade de contato induzida quando aplicado o hapteno dinitrofluorobenzeno (DNFB), na pele de camundongos, foi mediada pela expressão de MHC de classe I em queratinócitos. A subsequente aplicação do (DNFB) no animal produziu uma resposta inflamatória causada pelas células T citotóxicas. Em contrapartida, o animal apresentou uma hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) quando recebeu injeções de antígenos celulares (proteínas estranhas) e é mediada por MHC de classe II (CASTANO; MROZ; HANBLIN, 2006).

### **Dosagem de óxido nítrico**

A dosagem da concentração de NO nos sobrenadantes recolhidos após 24 e 48 horas de incubação na presença ou ausência de Con-A foi determinada pelo método de Griess (GREEN; TANNENBAUM, 1982). A partir desse experimento, nossos resultados mostram que a produção de óxido nítrico foi mais elevada nos animais submetidos à TFD, tanto na presença quanto na ausência da lectina. Porém, na presença da Con-A a produção de NO foi mais evidente na amostra 4 horas (figuras 5 e 6), sugerindo que a combinação da ftalocianina de silício – NzPc + laser influenciaram na produção de óxido nítrico.

Estudos relataram à influência do PPIX na geração do óxido nítrico em macrófagos coletados de camundongos saudáveis tratados com TFD. Os derivados de ALA sintetizados e relatados por KWITNIEWSKI et al. (2005) revelou, *in vitro*, um impacto diferente no sistema imunológico dos camundongos. O estimulante mais potente foi o derivado PP(Phe)<sub>2</sub>Arg<sub>2</sub>, que mostrou os valores mais elevados de NO<sub>2</sub> produzidos por macrófagos peritoneais. A ativação imunológica mais fraca foi a do derivado PP(Ser)<sub>2</sub>Arg<sub>2</sub>, entretanto nenhum resultado estatístico importante foi observado *in vivo*. Esses estudos mostraram que os derivados do ALA são capazes de induzir a liberação do óxido nítrico por macrófagos *in vitro* mesmo sem a irradiação do laser

O mecanismo do NO formado durante a TFD pode ser explicado pelo fato de que a TFD resulta em um aumento rápido e significativo de isoformas de óxido nítrico sintase (NOS). O aumento do NOS, nesses casos, ocorre devido à liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido pela TFD e de seu armazenamento dentro da célula, levando a um aumento na produção de NO que é responsável pela indução da apoptose (DALBASTI *et al.*, 2002).

Estudos feitos por KORBELIK e *cols* (2000) mostraram que quando um inibidor da síntese de NO, o L-NAME, foi injetado imediatamente após o tratamento da TFD, ocorreu um decréscimo dramático no fluxo sanguíneo de tumores pouco imunogênicos como o de células escamosas murinos (SCCVII). O padrão do fluxo sanguíneo alterado nos tumores após TFD indica que, mesmo com doses curativas, a circulação regular pode ser restaurada em alguns vasos sanguíneos após episódios de parcial ou completa obstrução. Sendo assim, eles concluíram que o NO participa de eventos associados com a TFD para a destruição do tumor, particularmente na resposta vascular, a qual é essencial para a cura em consequência desta terapia.

A ação do NO depende da célula T reconhecer um antígeno específico levando, em muitos casos, a produção de  $\text{IFN-}\gamma$ , um importante co-indutor da síntese de NO. Dependendo do estímulo antigênico (como o LPS) o NO desenvolve um mecanismo de "feedback", prevenindo a excessiva ativação das células T assim como a produção de citocinas e conseqüentemente a inibição da produção de NO. Neste contexto, possivelmente o NO pode ser visto como um modulador imune (COSTA *et al.*, 2003). A ausência de outras citocinas também pode alterar a resposta imune do hospedeiro. Assim sendo a ausência da IL-2 deixaria a célula T incapaz de responder a estímulos antigênicos subseqüentes, ou seja, induziria a célula T a um estado anérgico (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002).

Não podemos deixar de relatar que o óxido nítrico produzido por macrófagos também tem sido descrito como agente citotóxico, podendo inativar a enzima ribonucleotídeo redutase em esplenócitos de camundongos normais, impedindo assim a síntese de DNA e, portanto a replicação celular atuando portanto, como um agente imunossupressor (LEPOIVRE *et al.*, 1990).

### **Histologia**

Na amostra Pc 24 horas e na amostra TFD 24 horas, os resultados indicam uma maior evidência da polpa branca como podemos observar na (figura 8). Esse achado poderia indicar uma possível resposta imunológica, devido ao contato desse animal com uma substância estranha que no caso desse trabalho foi a Ftalocianina de silício – NzPc. O aumento na evidência da polpa branca e o restauro (ainda que parcial) da proliferação celular (figura 4) ocorridas no mesmo período (24 horas) podem ser uma mera coincidência ou indicar que os efeitos de mediadores pró-inflamatórios assim como a produção de citocinas imunoestimulatórias podem ter sido restauradas.

## 6 CONCLUSÃO

- Os animais irradiados com o laser apresentaram uma resposta proliferativa aumentada em relação ao controle. Animais submetidos à TFD apresentaram resposta proliferativa diminuída ao longo dos tempos analisados, indicando que nesses casos a proliferação celular dos esplenócitos murinos estava alterada.
- A produção de óxido nítrico espontânea (na ausência de Con-A) foi mais elevada em animais submetidos à TFD em todos os tempos analisados. Animais somente irradiados também produziram quantidades significativas de NO em comparação com o controle. Aqueles tratados somente com NzPc produziram NO em pequena quantidade.
- A produção de óxido nítrico na presença de Con-A apresenta-se aumentada para os animais controle e para aqueles irradiados somente. Animais submetidos a PDT tiveram produção de NO significativa somente no período de 4 horas.
- Na análise histológica percebemos uma melhor definição da polpa branca nos animais sacrificados após 24 horas de TFD ou que foram injetados somente com a NzPc.

## REFERENCIAS

- ALCANI, A. Viral mimicry of cytokines chemokines and their receptors. **Nature Reviews/Immunology**, v.3, p.36-50, 2003.
- ALEXANDROVA, R; MILEVA, M; ZVETKOVA, E. Nitric oxide and cancer. **Experimental Pathology and Parasitology**, v.4, n.7, p.13-17, 2001.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. *et al.* Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)**, v.98, n.6, p.843-848, 2003.
- ARAD, O. *et al.* Porfíricos para a fotoquimioterapia do câncer e outras aplicações biomédicas. **Revista de Química Teórica Aplicada**, v.8, 2002.
- BARRETO, R. L. *et al.* Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v.28, n.6, p.1046-1054, 2005.
- BENJAMINI, E; COICO, R; SUNSHINE, G. Mecanismo de controle da resposta imune. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.125-134.
- BILLADEAU, D. D; NOLZ, J. C; GOMEZ, T. Regulation of T cell activation by the cytoskeleton. **Nature Reviews/Immunology**, v.7, p.131-143, 2007.
- CASTANO, A. P; MROZ, P; HAMBLIN, M. R. *et al.* Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Publishing Group**, v.6, p.535-545, 2006.
- CECIC, I; PARKINS, C. S; KORBELIK, M. Induction of systemic neutrophil response in mice by photodynamic therapy of solid tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.5, p.712-720, 2001.
- CERQUEIRA, N. F; YOSHIDAM, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.
- COSTA, M. T. *et al.* Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v.33, p.967-974, 2003.
- DALBASTI, T. *et al.* Online electrochemical monitoring of nitric oxide during photodynamic therapy. **Nitric Oxide Biology and Chemistry**, v.7, p.301-305, 2002.
- DOLMANS, D. E. J. G. J. *et al.* Photodynamic therapy for cancer. **Nature Publishing Group**, v.3, p.380-387, 2003.
- DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Inst.**, v.90, p.889-905, 1998.
- GLEREAN, A. Órgãos linfáticos. **Manual de Histologia Textos e Atlas para os Estudantes da Área da Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2002. p.103-111.

GOLLNICK, O. S; OWCZARCZAK, B; MAIER, P. Photodynamic therapy and ant-tumor immunity. **Lasers in Surgery and Medicine.**, v.38, p.509-515, 2006.

GREEN, L. C; TANNENBAUM, S. R. Analysis os nitrate, nitrite and (<sup>15</sup> N) nitrate in biological fluids. **Anal Biochemistry.**, v.126, p.131-138, 1982.

GUPTA, S; AHMAD, N; MUKHTAR, H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy – mediated apoptosis. **Cancer Research.**, v.58, p.1785-1788, 1998.

Biologic mechanisms of PDT. **Photodynamic Therapy of Cancer.** Canada: (Edited by Kute, D; Pollock, J; Weichselbaum, R. R; Bast, R. J; Granster, T; Frei, J), 2003. p.605-622.

HASAN, T., et al. Photodynamic therapy of cancer., *In* . KUTE, D. et al. (ed.). **Cancer medicine.** Hamilton, Ontario, Canada: Decker Inc., 2003. p.605-622.

HENDERSON, B. W; SITNIK-BUSCH, T. M; VAUGHAN, L. A. Potentation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. **Photochemistry and Photobiology.**, v.70, n.1, p.64-71, 1999.

HERWIG, K; OBWEGESER, A. JAKOBER, R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, v. 36, p.157-168, 1996.

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.

KEMPER, C; ATKINSON, J. T cell regulation: with complements from innate immunity. **Nature Reviews/Immunology.**, v.7, p.9-18, 2007.

KORBELIK, M. *et al.* Nitricoxide production by tumour tissue : impact on the response to photodynamic therapy. **British Journal of Cancer.**, v.82, p.1835-1843, 2000.

KORBELIK, M; NARAPARAJU, V. R; YAMAMOTO, N. Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer. **British Journal of Cancer.**, v.75, p.202-207, 1997.

KOUTMÁ, M; JANISCH, R; VESELSKÁ, R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. **Scripta Medica (BRNO).**, v.76, n.3, p.163-172, 2003.

KROUSIS, P. C. *et al.* Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. **Cancer Research.**, v.67, n.21, p.10502-10510, 2007.

KWITNIEWSKI, M. *et al.* Influence of diamino acid derivatives of protoporphyrin IX on mouse immunological system: Preliminary results. **Journal Photochemistry Photobiology B: Biology.**, v.81, p.129-135, 2005.

LEPOIVRE, M. *et al.* Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating path-way in adenocarcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**., v.265, p.14143-14149, 1990.

MOAN, J; PENG, Q; KONGSHAUG, M; EVENSEN, J. F; ANHOLT, H; RIMINGTON, C. Sensitizer for photodynamic therapy of cancer: a comparison of the tissue distribution of Photofrin II and aluminum phthalocyanine tetrasulfonate in nude mice bearing a human malignant tumor. **International Journal of Cancer**., v.48, p.258-264, 1991.

MORIYAMA, E. *et al.* Resposta *in vitro* de células gliossarcomas 9l após terapia fotodinâmica utilizando imagem de bioluminescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**., v.51, n.1, p.15-22, 2005.

NOVOSOLEVA, E. G. *et al.* Effects of low-power laser radiation in mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**., v.22, p.33-38, 2006.

PAZOS, M.D.C; NADER, H. B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matriz and associated components. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., v.40, n.8, p.1025-1035, 2007.

PERES, C. M; CURI, R. **Proliferação celular**. Como Cultivar Células. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2005. p.50-55.

PINHO, M. S. L. Como as proteínas regulam a proliferação celular. **Revista Brasileira de Coloproctologia**., v.19, p.223-225, 1999.

RÉ, M. I. *et al.* New PHB/PHPE microspheres obtained from *Burkbolderia cepacia* as biodegradable drug delivery systems for photodynamic therapy. **Minerva Biotecnologia**., v.18, p.3-9, 2006.

ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. Mononuclear phagocytes in immune defence. **Immunology**. London: Mosby, 2001. p.147-162.

ROSENKRANZ, A. A; JANS, D. A; SOBOLEV, A. S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. **Immunology and Cell Biology**., v.78, p.452-464, 2000.

SIBATA, C. H; OLEINICK, N. L; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., v.33, p.689-880, 2000.

VAZQUEZ, M. S.; ORTIZ, J.; NESTEROVA, I. V.; LÁZARO, F. F.; SANTOS, A. S.; SOPER, S. A.; VICENTE, M. G. H. Synthesis and proprieties of cell- targeted Zn(II)-phthalocyanine-peptide conjugates. **Bioconjugate Chemistry**., v.18, p.410-420, 2007

WHEELER, B. L. *et al.* A silicon phthalocyanine and a silicon naphthalocyanine: synthesis, electrochromistry, and electrogenerated chemiluminescence. **Journal of the American Chemical Society**., v.106, p.7404-7410, 1984.

WINK, D. A. *et al.* The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis.**, v.19, n.5, p.711-721, 1998.

**ANEXO A**

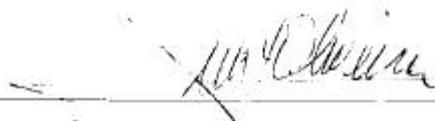
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA**  
**UNIVAP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º **A080/CEP/2007**, sobre “**Resposta imune celular frente a terapia fotodinâmica**” sob a responsabilidade de **Maria Angélica G. Cardoso** foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 02 de agosto de 2007.



**PROF. DR. LUÍS VICENTE FRANCO DE OLIVEIRA**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Vale do Paraíba – Univap