

Expressão das Citocinas TNF, IL-17A, IL-4 e IL-10 em Células Mononucleares do Sangue Periférico Irradiadas “*in vitro*”

Ademir de Jesus Amaral¹, Lidía Lúcia Bezerra Leite¹, Ayala Gomes do Nascimento¹, Ewerton Clementino Diniz¹, Gicielne Freitas da Silva¹, Samuel César Dantas², Thiago de Salazar e Fernandes^{1,3}, Edvane Borges da Silva^{1,4}, Robson Cavalcante Veras⁵, Isac Almeida de Medeiros⁵, Mariana Brayner Cavalcanti^{1*}

¹Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR/DEN/UFPE)

²Setor de Radioterapia do Instituto Medicina Integrada Prof. Antônio Figueira (IMIP/PE)

³Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR/UFPE)

⁴Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE)

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF/UFPB)

*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Energia Nuclear

Av. Prof. Luiz Freire, N. 100, Várzea, Recife, PE, Brasil, CEP: 54740-540

Email: maribrayner@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine and to compare the profile of cytokines produced by non-irradiated and irradiated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the possible application of this analysis as a biomarker of individual radiosensitivity. For this, peripheral blood (PB) samples were collected from seven healthy volunteers, and each sample divided in two aliquots: one aliquot was irradiated with a dose of 2 Gy (from a 6MV Linear Accelerator) and while the other one was kept non irradiated. All PBMCs were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% Bovine Fetal Serum for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. The cytokines TNF, IL-17A, IL-4 and IL-10 were measured by flow cytometry. Wilcoxon test was performed with the level of significance of 95%. In the irradiated samples it was observed a slight increase of the median of the level of cytokines TNF, IL-4 and IL-10 (from 1040.9 to 1196.1 pg/mL, from 127.3 to 138 pg/mL, and from 99.9 to 120.8 pg/mL, respectively) and a slight decrease in median of cytokines IL-17A (from 841.1 to 799.4 pg/mL). In addition to this evidence, there was a high inter-individual variability of cytokine concentrations in response to irradiation. It was observed that some individuals are more responsive to the expression of some inflammatory proteins after exposure to X-rays. Although further studies are necessary, the hypothesis that raises is that these biomarkers could be predictor of future individual responses to ionizing radiation exposure.

Key words: Cytokines; Inflammation; Radiosensitivity; Biomarker

RESUMO

A presente pesquisa objetivou determinar e comparar o perfil de citocinas produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) não irradiadas e irradiadas *in vitro*, bem como sua possível aplicação como biomarcador de radiosensibilidade individual. Foram coletadas amostras de sangue periférico (SP) de sete voluntários saudáveis. De cada amostra, uma alíquota de SP foi irradiada com dose de 2Gy de raios-X enquanto outra alíquota foi mantida como controle (não irradiada). As PBMCs foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Foram quantificadas as citocinas TNF, IL-17A, IL-4 e IL-10 utilizando o citometro de fluxo. Foi utilizado o teste de Wilcoxon a um nível de significância de 95%. Observou-se, nas amostras irradiadas, um discreto aumento da mediana dos níveis das citocinas TNF, IL-4 e IL-10 (de 1040,9 para 1196,1 pg/mL; de 127,3 para 138 pg/mL e de 99,9 para 120,8 pg/mL, respectivamente) e uma discreta diminuição da mediana da citocina IL-17A (de 841,1 para 799,4 pg/mL), estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Verificou-se uma elevada variabilidade interindividual das concentrações das citocinas em resposta à irradiação. Constatou-se que alguns indivíduos são mais responsivos quanto à expressão de algumas proteínas inflamatórias após exposição aos raios-X, indicando a possibilidade de emprego destes biomarcadores como teste preditivo da resposta individual à radiação ionizante antes de uma radioterapia, em uma abordagem de medicina de precisão.

Palavras-chaves: Citocinas; Inflamação; Radiossensibilidade; Biomarcador

1. INTRODUÇÃO

A radioterapia (RT), isoladamente ou combinada à quimioterapia, é uma das opções de tratamento mais utilizada no combate ao câncer. No entanto, em muitos casos, as reações adversas associadas à RT, em resposta à interação da radiação ionizante (RI) com os tecidos sadios circunvizinhos ao tumor, constituem um fator limitante à eficácia desse tratamento. Dentre as reações adversas decorrentes da RT, a inflamação merece destaque (Travis, 2007; Borràs-Fresneda et al., 2016).

Alguns pacientes submetidos à RT apresentam sinais típicos de um quadro inflamatório agudo decorrentes de uma cascata de transdução de sinais celulares induzida pela interação da radiação com o tecido sadio adjacente ao tumor. Essa condição provém de uma exacerbação da resposta imunológica sendo uma reação adversa limitante da radioterapia e apresentando-se de forma singular em cada indivíduo (Ryan, 2012; Burnette; Weichselbaum, 2013; Frey et al. 2015).

A variabilidade na resposta individual às RIs – ou seja, os diferentes graus de radiosensibilidade – por ser reconhecidamente um aspecto importante para a eficácia da RT, há um esforço internacional pela busca de novos testes preditivos das reações adversas exacerbadas (Beaton et al., 2013). Nesse sentido, pesquisas envolvendo metabólitos celulares vêm ganhando espaço como potenciais biomarcadores de sensibilidade às RIs, a exemplo de uma classe de proteínas denominada citocinas. As citocinas estão intimamente associadas ao grau de lesão tecidual. Estas proteínas são expressas em quantidades ínfimas no estado fisiológico basal, no entanto, a perturbação desse estado de

equilíbrio por um agente agressor estimula sua produção. A intensidade deste quadro varia em função da radiosensibilidade individual e constitui um dos fatores limitantes da RT. Portanto, a análise de citocinas pode vir a ser útil na identificação do grau de radiosensibilidade individual, visto que esta classe de proteínas está relacionada ao processo inflamatório (Di Maggio et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi determinar e comparar o perfil de citocinas produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) não irradiadas e irradiadas, bem como sua possível aplicação como biomarcador de radiosensibilidade individual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras biológicas e Aspectos Éticos

Foram coletados 18 mL de sangue periférico, em tubos contendo heparina sódica, de sete indivíduos (quatro mulheres e três homens) saudáveis (identificados como: I, II, III, IV, V, VI e VII), com faixa etária entre 18 e 62 anos. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da coleta, seguindo as recomendações do comitê de ética em seres humanos da UFPE (parecer nº 1084.387).

2.2 Procedimento de irradiação

Da amostra coletada, 9 mL foram irradiados “*in vitro*” com raios-X, recebendo a dose de 2 Gy com Acelerador Linear de 6MV (Modelo Primus, Siemens; localizado no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira) e 9 mL do sangue foram mantidos como controle (não irradiado). Após a irradiação, as amostras foram processadas para obtenção das células mononucleares.

2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

As amostras de sangue periférico foram depositadas sobre uma solução de Ficoll (densidade de $1,077 \pm 0,001 \text{ g.mL}^{-1}$) (GE Healthcare) na proporção de 1:1 e centrifugadas a $400 \times g$ por 45 minutos. As PBMCs obtidas foram lavadas com solução de PBS na proporção de 1:2 e as amostras foram centrifugadas a $350 \times g$ por 15 minutos. A cada botão celular obtido foi adicionado 5mL de meio de cultivo RPMI1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil).

2.4 Ajuste da concentração celular

Ao volume de $50 \mu\text{L}$ da suspensão celular final obtida no item anterior foi adicionado à $50 \mu\text{L}$ do corante azul de tripan 0,4% v/v (Sigma-Aldrich, Brasil) ou seja, na proporção 1:1. As células foram

depositadas em câmara de Neubauer e analisadas quanto a viabilidade por microscopia óptica. A concentração celular foi ajustada para 5×10^5 células/150 μ L e 1×10^6 células/mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SBF para ensaio de citotoxicidade e de quantificação de citocinas, respectivamente.

2.5 Ensaio de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado *in vitro* em cultura de PBMCs e quantificado pelo método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo). Após 48 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, foi adicionado à solução de MTT-sal de tetrazolium (Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5mg/mL e as placas retornaram à incubadora por mais 3 horas. Em seguida, foram adicionados 120 μ L da solução de SDS 20% para dissolução do precipitado. Após 24 horas, a absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 570nm (Modelo EL808, BioTek, USA).

2.6 Cultura celular

As PBMCs isoladas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, 10% de SFB, 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Cultilab, Brasil). Estas células foram cultivadas na presença e ausência do PMA (Phorbol 12-myristate, 13-acetate) (Sigma-Aldrich, Brasil) e Ionomicina (Sigma-Aldrich, Brasil) durante 48 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C. O PMA e a ionomicina foram utilizadas como estímulo à proliferação celular e à produção de citocinas. Após o período de incubação os sobrenadantes foram retirados, armazenados e acondicionados à -20°C até o momento da realização do CBA.

2.7 CBA (Citometric Bead Array)

Os sobrenadantes de cultura de PBMCs foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCanto II FlowCytometer, por CBA. As citocinas presentes foram detectadas utilizando o kit CBA Human TH1/Th2/Th17 cytokine (BD Biosciences, USA), seguindo as recomendações dos fabricantes. As citocinas TNF, IL-17A, IL-4 e IL-10 (limites de detecção de 2,8; 18,9; 4,9; 4,5 pg/mL, respectivamente) foram avaliadas considerando-se o Índice Médio de Fluorescência (IMF). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo utilizando o software FACSDiva. Para as análises das aquisições utilizou-se o software FCAP.

2.8 Análise estatística

Foi realizado teste de Wilcoxon para verificar diferenças entre os tratamentos com software BioEstat 5.0. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

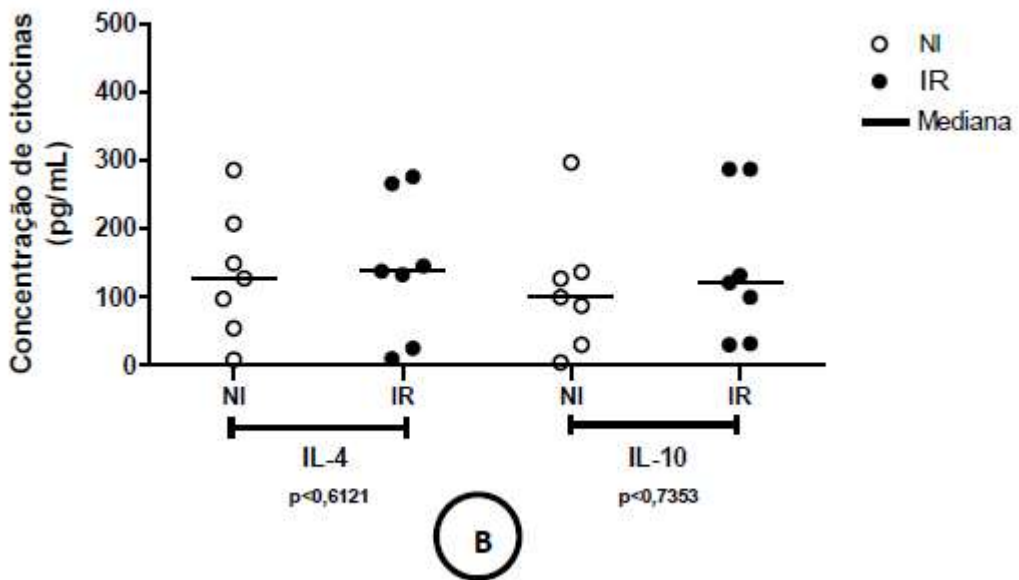
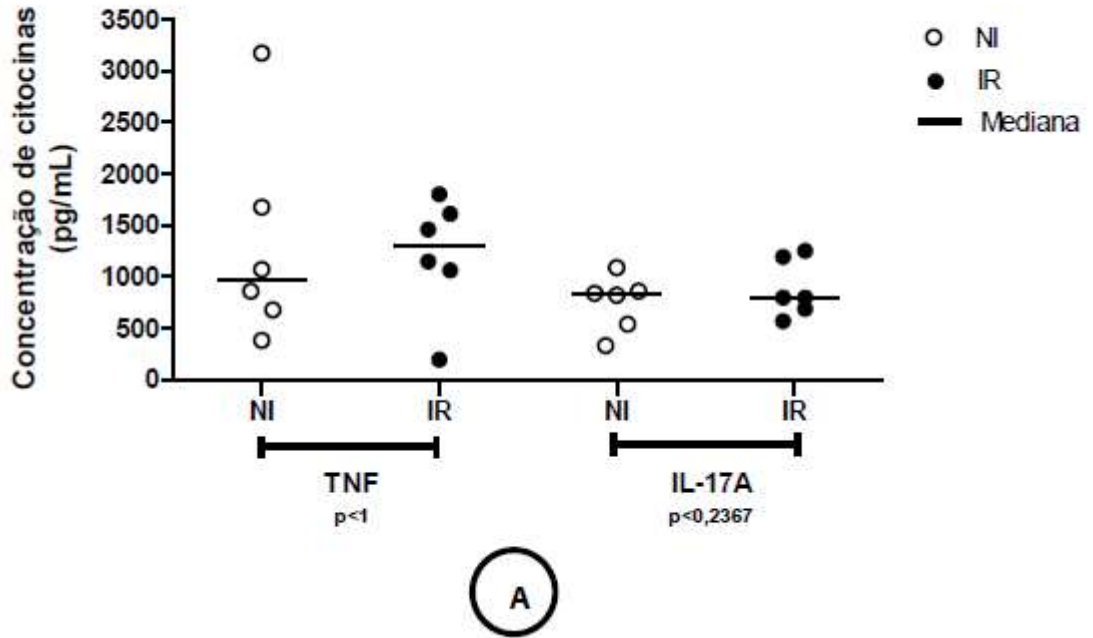
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar o efeito da radiação ionizante na viabilidade celular, foi utilizado o teste do MTT. A viabilidade foi determinada após a irradiação e o cultivo celular de 48 horas. Tanto para as amostras irradiadas quanto não irradiadas, as viabilidades foram $\geq 80\%$.

Uma vez que a dose de 2 Gy não se mostrou tóxica às PBMCs, nas condições experimentais adotadas, foram determinados os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias antes e após a exposição à radiação ionizante. A Figura 1 (A) e (B) apresenta as dispersões e as medianas dos perfis das citocinas (em pg/mL) TNF, IL-17A, IL-4 e IL-10 das amostras de sangue não irradiadas e irradiadas, cultivadas por 48 horas e estimuladas com PMA+IONO. Na Figura 1(A), é possível observar aumento da mediana da citocina pró-inflamatória TNF pós-irradiação (de 1040,9 para 1196,1 pg/mL, ou seja, um aumento de 15%) e diminuição da mediana da citocina IL-17A (de 841,1 para 799,4 pg/mL, ou seja, uma diminuição de 5%). Essas alterações não foram estatisticamente significativas. Na Figura 1(B), observa-se um discreto aumento das medianas das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 pós-irradiação (respectivamente, de 127,3 para 138 pg/mL, um aumento de 4%, e de 99,9 para 120,8 pg/mL, aumento de 21%). As diferenças nos níveis de expressão destas citocinas também não foram estatisticamente significativas. Ademais, é possível observar na Figura 1(A e B) elevada dispersão dos dados em torno da mediana das citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias, demonstrando alta variabilidade interindividual na expressão de citocinas.

Com relação à expressão de citocinas, as diferentes respostas obtidas individualmente podem ter repercussão quanto aos efeitos estimulatórios e inibitórios da resposta inflamatória, uma vez que as citocinas TNF e IL-17A são pró-inflamatória, enquanto as IL-4, IL-10 são de resposta anti-inflamatória (François et al., 2013). Com isso, a análise destes perfis se torna complexa, uma vez que um mesmo indivíduo pode apresentar um aumento de expressão de citocina pró-inflamatória (e.g., TNF) e anti-inflamatória (e.g., IL-10), que concomitantemente podem trazer um efeito nulo, benéfico ou maléfico para um indivíduo exposto em um cenário real. Há comprovações de que a IL-4, que é uma citocina anti-inflamatória, após exposição à altas e baixas doses de radiação ionizante, o que indica a indução de uma resposta anti-inflamatória radioinduzida (Manda et al., 2012; Di Maggio et al., 2015).

FIGURA 1. Dispersão dos níveis de citocinas das amostras não irradiadas (NI) e irradiadas (IR) na condição PMA-IONO



Através de registros do acidente nuclear de Chernobyl, foram evidenciadas modificações dos perfis de citocinas de trabalhadores de limpeza do reator ("*cleanup workers*") com diminuição significativa de IFN, que é pró-inflamatória. No mesmo estudo, foram avaliadas as citocinas TNF- α , IL-4 e IL-6 em plasma e em cultura de PBMCs, em que foi verificado que as concentrações de TNF- α e IL-4 permaneceram estáveis, enquanto os níveis de IL-6 (pró-inflamatória) aumentaram (Kurjane et al., 2009). Estes dados reforçam que a análise de citocinas não é de fácil interpretação, porque citocinas pró e anti-inflamatória são hora estimuladas, hora inibidas, em um mesmo indivíduo.

Em outro estudo, verificou-se a expressão de IL-10 em função do tempo após irradiação, foi observado que a citocina permanece inalterada até o terceiro dia, a partir do qual começa a diminuir quantitativamente (Lim et al., 2016). Na presente pesquisa, somente foi avaliada a expressão da citocina após dois dias e, neste período, a expressão também permaneceu praticamente inalterada.

A análise dos níveis séricos de IL-10 e TNF- α em pacientes com carcinoma hepatocelular, antes e após radioterapia constatou aumento na expressão da IL-10, enquanto as citocinas TNF não variaram significativamente após o tratamento (Cha et al., 2017). Dosagens de citocinas durante o tratamento radioterápico mostraram não haver alterações significativas nos níveis séricos de TNF- α e IL-10 (Holliday et al., 2016).

Na atual proposta, a falta de um padrão de alterações de citocinas após irradiação pode ser atribuída ao tempo de cultura escolhido (48 h), pois parte das proteínas estudadas são precoces e com baixa meia vida plasmática, a exemplo da TNF, com meia-vida de 10 e 20 minutos (Oliveira et al., 2011). Além disso, como a secreção de citocinas não é determinada exclusivamente pela exposição às radiações ionizantes, há de se considerar que parte do perfil de expressão se deve a um possível efeito combinado da radiação e outros fatores biológicos e ambientais. Estes estudos podem contribuir na predição da radiosensibilidade individual a partir do perfil de alteração dos níveis basais de citocinas após irradiação.

4. CONCLUSÕES

Diante de resultados contraditórios da literatura (i) que apresentam aumento como diminuição ou estabilidade dos níveis de expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias; (ii) com base nos mesmos resultados na presente pesquisa e (iii) utilizando o padrão metodológico, conclui-se que somente uma resposta 'paciente-específica' de perfil de expressão de citocinas poderá permitir um perfil próprio relacionado às possíveis reações à uma radioterapia baseada na medicina personalizada.

O número de indivíduos empregados nesta pesquisa não permitiu estabelecer um perfil de citocinas como biomarcadores de exposição às radiações ionizantes. No entanto, verificou-se que alguns

indivíduos são mais responsivos que outros à variação nos níveis dessas proteínas após irradiação, motivando o uso dessa metodologia em pesquisas envolvendo radiosensibilidade individual.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Facepe), pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATON, L. A. et al. Investigating γ H2AX as a Biomarker of Radiosensitivity Using Flow Cytometry Methods. **Plos One**, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- BORRÀS-FRESNEDA, M. et al. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Lin. **Scientific Reports**, v.6. p. 1-11, 2016
- BURNETTE, B.; WEICHELBAUM, R. R. Radiation as an Immune Modulator. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 23, n. 4, p. 273–280, out. 2013.
- CHA, H.; LEE, E. J.; SEONG, J. Multi-analyte analysis of cytokines that predict outcomes in patients with hepatocellular carcinoma treated with radiotherapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 11, p. 2077, 2017.
- DI MAGGIO, F. et al. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. **Journal of Inflammation**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.
- FRANÇOIS, A. et al. Inflammation and Immunity in Radiation Damage to the Gut Mucosa. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- FREY, B. et al. Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malignant diseases. **Cancer Letters**, v. 368, n. 2, p. 230–237, nov. 2015.
- KURJĀNE, N. et al. Ageing and production of the cytokines in Chernobyl clean-up workers from Latvia. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, Natural, Exact and Applied Sciences**, v. 63, n. 3, 1 jan. 2009.
- LIM, S. et al. Effect of irradiation on cytokine secretion and nitric oxide production by inflammatory macrophages. **Genes & Genomics**, v. 38, n. 8, p. 717–722, ago. 2016.
- MANDA, K. et al. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic and T cells. **Frontiers in Oncology**, v. 2, 2012.
- RYAN, J. L. Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 985–993, mar. 2012.

TRAVIS, E. L. Genetic Susceptibility To Late Normal Tissue Injury. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 17, n. 2, p. 149–155, abr. 2007.

HOLLIDAY, E. B. et al. Relationship between fatigue, sleep quality and inflammatory cytokines during external beam radiation therapy for prostate cancer: A prospective study. **Radiotherapy and Oncology**, v. 118, n. 1, p. 105–111, jan. 2016.

OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.