

AÇÃO DA LUZ POLARIZADA DE ESPECTROS VERMELHO, VERDE E AZUL SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES INFLAMATÓRIAS PERITONEAIS MURINAS

ACTION GREEN, RED AND BLUE POLARIZED LIGHT IN THE PHAGOCYtic INFLAMMATORY MONONUCLEAR CELL PERITONEAL MOUSE

Cardoso, CC*; Campos, JC*; Gabriel, WC*; Passeti, TA**

RESUMO: Inflamação é uma resposta complexa a vários estímulos endógenos e exógenos capazes de provocar uma agressão celular no tecido conjuntivo vascularizado. A resposta é frequentemente acompanhada de manifestações fisiológicas que envolvem células e proteínas que tem a finalidade de eliminar uma agressão, cicatrizar e reconstituir o tecido lesado. A figura central da inflamação é o macrófago por produzir um grande número de substâncias biologicamente ativas, e sua capacidade de fagocitar e eliminar agentes agressores. Cromoterapia é um método de tratamento que usa a luz visível. A luz é uma radiação eletromagnética, que penetra nos tecidos e auxilia no tratamento de doenças. Sabendo destes conceitos, este trabalho tem por finalidade avaliar a ação de luz polarizada de espectro vermelho, azul e verde sobre a capacidade fagocítica de macrófagos inflamatórios do peritônio de camundongos. Os resultados demonstraram que luzes de diferentes polaridades agem sobre os macrófagos alterando a ação fagocítica dessas células. As luzes azul e verde aumentam a fagocitose, enquanto a luz vermelha inibe a atividade macrofágica.

PALAVRAS-CHAVE: Inflamação. Macrófagos. Cromoterapia. Fagocitose. Luz polarizada.

ABSTRACT: *The concept of inflammation reports to a complex response triggered by several endogenous and exogenous stimuli and capable of inducing cellular aggression to connective tissue. This response is frequently associated with physiological events involving cells and proteins that ultimately will abrogate the aggression and lead to tissue healing. Macrophages have a key role in the inflammatory process, related to a large number of biologically active substances released by these cells. Chromotherapy is a treatment modality that utilizes the visible light and its ability to penetrate the tissues to promote therapeutic actions. The aim of this study was to evaluate the effects of the application of polarized red, green, and blue light on activated macrophage function. Irradiation with red was associated with a significant reduction of the phagocytic capacity of mononuclear cells at the peritoneal cavity. However, blue and green light irradiations were associated with a significant increase of the phagocytic capacity of mononuclear cells at the peritoneal cavity.*

KEYWORDS: *Inflammation. Macrophages. Chromotherapy. Phagocytosis. Polarized light.*

* Cilene Chinaglia Cardoso, Juliana Carvalho Campos, Wagner da Costa Gabriel – Biomédicos.

** Tânia Aguiar Passeti – Profa. Dra. da Universidade Bandeirante de São Paulo – taniapa@directnet.com.br

INTRODUÇÃO

Inflamação

Inflamação é a reação de um tecido e de sua microcirculação a uma lesão. Esta se caracteriza pela produção de mediadores inflamatórios, movimentação de líquido e leucócitos do sangue para os tecidos extravasculares. Com frequência, é uma expressão da tentativa do hospedeiro de localizar e eliminar células com alteração metabólica, partículas estranhas, microrganismos e/ou antígenos¹.

O objetivo básico da resposta inflamatória é eliminar o agente causador da lesão e remover os componentes do tecido lesado. Esse processo promove regeneração da arquitetura normal do tecido e o retorno da função fisiológica ou a formação de tecido cicatricial para substituir o que não pode ser reparado. A lesão extensa ou os próprios efeitos da resposta inflamatória podem acarretar perda da função do tecido ou do órgão.

Os eventos vasculares são centrais no início do processo inflamatório. As alterações vasculares são induzidas por mediadores químicos, como a histamina e serotonina liberadas pela ativação de mastócitos teciduais. Essas moléculas agem diretamente na vênula, propiciando vasodilatação e alterações da permeabilidade capilar².

As células e mediadores do processo inflamatório estão confinados nos vasos sangüíneos; com o aumento da permeabilidade capilar, os componentes da inflamação deixam os vasos e chegam ao tecido lesado. Os tipos de células encontrados na região lesada, bem como sua preponderância e fase de chegada, dependem primariamente da natureza do desafio antigênico e do local onde ocorre a reação. Em geral, os neutrófilos são as primeiras células a chegar aos locais, caracterizando a inflamação aguda. Após 24 horas do início do evento, começam a chegar os fagócitos mononucleares e os linfócitos. O resultado de uma reação aguda depende da eliminação do antígeno ou do agente infeccioso; se o agente não é eliminado, desenvolve-se uma reação inflamatória crônica³.

O monócito deixa a medula óssea após 24 horas de maturação e circula na corrente sangüínea por aproximadamente 17,4 horas. Durante esse período, essa célula pode migrar para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos^{4,5,6}.

Fagocitose é a atividade celular de englobar, internalizar e digerir partículas, realizada com extrema competência pelas células macrofágicas⁷.

A partícula fagocitada é internalizada no fagossomo, no interior do qual ocorre a liberação de enzimas líticas pela fusão de lisossomos e formação de radicais ativos de oxigênio. Em que pese não estar ainda totalmente esclarecido o mecanismo ou mecanismos que determinam a morte de partículas vivas no interior do fagossomo, a participação de radicais ativos do oxigênio no processo é amplamente demonstrada⁸. Após a morte

e digestão da partícula, a célula elimina os dejetos ligando o fagossomo à membrana celular.

Cromoterapia

Nossa percepção das cores está associada a três fatores: uma fonte de luz; a capacidade do olho humano em diferenciar os estímulos produzidos por diferentes cores; e os materiais que apresentam cores distintas⁹.

O que denominamos luz branca é uma mistura ou o resultado da presença concomitante de luz nas seguintes cores: vermelho, alaranjado, amarelo, verde, azul, anil e violeta. A decomposição da luz branca nas suas cores componentes pode ser observada quando ela incide, por exemplo, num prisma, uma vez que ao atravessá-lo cada uma das cores sofre um desvio polarizado. A este conjunto de sete cores distintas de luz polarizada, que somadas resultam na luz branca, denominamos espectro de luz visível (Figura 1)⁹.

Cor	Comprimento de onda	Frequência
Vermelho	~ 625-740 nm	~ 480-405 THz
Laranja	~ 590-625 nm	~ 510-480 THz
Amarelo	~ 565-590 nm	~ 530-510 THz
Verde	~ 500-565 nm	~ 600-530 THz
Ciano	~ 485-500 nm	~ 620-600 THz
Azul	~ 440-485 nm	~ 680-620 THz
Violeta	~ 380-440 nm	~ 790-680 THz

(Adaptado de: www.wikipedia.org)

Figura 1: Espectro de Luz Visível

A luz polarizada é estudada e usada com finalidades terapêuticas desde os primórdios da medicina. Estudos mais recentes demonstraram que a luz penetra no corpo, principalmente através dos olhos, tendo uma ação sistêmica¹⁰.

No século XX, o estudo e o uso das cores foram abordados em uma terapia denominada cromoterapia^{11,12}. A cromoterapia atua reequilibrando as alterações de energia global, sendo que cada cor tem seu efeito compensador para conseguir o equilíbrio orgânico¹³. Segundo recentes investigações, as atividades cromáticas das células do corpo são estimuladas e influem sobre os nervos e órgãos provocando transformações químicas nos mesmos¹³. Essas cores ou frequência de ondas ativam o sistema de defesa imunológica devido ao efeito bioestimulante celular¹⁴.

Estudos realizados com estados de enfermidades físicas e emocionais concluíram que existem relações diretas entre cores e determinados estados emocionais em que se descobriu, por exemplo, que as cores deficientes em pacientes com ansiedade foram azuis e verdes e em pacientes deprimidos obtém-se melhor resultado com a cor vermelha¹⁰.

Recentemente autores realizaram testes sobre a influência da luz azul sobre células de melanoma B16. Essas células após irradiação foram inoculadas em camundongos, e avaliou-se, a seguir, a presença de metástases nos animais. Os resultados demonstraram uma menor incidência de metástases nos animais irradiados se comparados aos do *grupo controle*¹⁵.

Como a luz penetra em tecidos biológicos, tendo uma ação cromática nas células, resolvemos evidenciar cientificamente as propriedades das cores azul, vermelha e verde em relação às células inflamatórias mononucleares, em especial os macrófagos ativados e não ativados, uma vez que essas células são fundamentais no processo inflamatório.

OBJETIVO

Analisar a ação da luz polarizada com espectros azul, verde e vermelho sobre a atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss*, ativos ou não, pela inoculação intraperitoneal (i.p.) de BCG.

MATERIAL E MÉTODO

Bacilo de Calmette-Guérin (BCG):

Foram utilizados flaconetes o bacilo *Mycobacterium bovis* cepa Moreau denominado *Bacilo de Calmette-Guérin* (BCG), contendo 40 mg por 5 mL. Os flaconetes foram obtidos no laboratório de vacinas do Instituto Butantã de São Paulo.

Divisão dos grupos *Controle* e *Inoculado*:

Para cada experimento realizado foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* de sexo masculino com aproximadamente 8 a 12 semanas de vida. Cada experimento continha 5 camundongos limpos como *grupo controle*, e outros 5 animais foram inoculados compondo o *grupo inoculado*.

Inoculação intraperitoneal em camundongos

Foi feita inoculação i.p. nos camundongos de 0,2 mL de BCG, e após um período de 7 dias os animais foram sacrificados e as células peritoneais coletadas. Os animais *controle* não foram inoculados.

Retirada das Células

Após sacrifício em câmara saturada de éter,

com uma tesoura de ponta fina e pinças a pele do camundongo foi deslocada, expondo a membrana do peritônio. Nesta cavidade, inoculou-se 5 mL de tampão fosfato (TF) com auxílio de seringa e agulha. A cavidade foi agitada, para realizar a lavagem dos órgãos, e retirou-se a solução com seringa e agulha, obtendo-se no lavado as células inflamatórias. A suspensão de células retirada dos camundongos foi colocada em tubos plásticos individuais.

Controle de volume e concentração celular

Uma amostra da suspensão celular foi fixada e corada com solução de 0,5% cristal violeta em ácido acético a 30%, na proporção de 10 µl do corante para 90 µl da suspensão celular. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer, obtendo-se como resultado o número total de células livres e porcentagem de diferentes tipos celulares, discriminadas em células mononucleares e polimorfonucleares.

As suspensões celulares foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 rpm e a concentração foi acertada para termos 2×10^6 célula por mL, concentração celular colocada em cada poço para aderirem às lamínulas de vidro.

Fixação das células

Em placa de cultura celular com 6 poços, foi colocada uma lamínula de vidro limpa e esterilizada. Sobre essas lamínulas foram colocados 0,2 mL da suspensão celular, dos grupos *controle* e *inoculado com BCG*. Essas placas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para fixação das células no vidro. Após esse procedimento, os poços foram lavados com TF para remover as células não aderentes. A seguir, foi adicionado 2 mL de TF em cada poço de experimentação.

Incidência da luz polarizada sobre macrófagos

Foi colocada a placa do grupo *controle* em sala com ausência de luz, e a placa do grupo experimental foi colocada em caixa preta com luz polarizada irradiando com os intervalos ilustrados no quadro 1 e foi repetido com diferentes células para a luz polarizada nas cores azul, verde e vermelha.

Intervalo	Minutos	Luz
Primeiro	20	Incidindo
Segundo	5	Apagada
Terceiro	20	Incidindo

Quadro 1: Esquematização do intervalo de tempo¹⁵.

Fungo *Sacharomyces sp*

Em um tubo cônico plástico de 15 mL, foi diluído o fungo *Sacharomyces sp* em 10 mL de TF, esta solução foi centrifugada por dois minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante removido. Este processo foi repetido por três vezes, e a concentração de fungo foi contada em câmara de Neubauer de modo que se obtivesse 2×10^7 fungos/mL de diluição final no poço.

Ao retirar as placas de cultura da caixa preta, foi adicionado 2×10^7 fungos /mL em cada poço. As placas foram colocadas na estufa a 37°C por 60 minutos.

As placas foram retiradas da estufa e lavadas com 2 mL de TF por poço, para retirar o excesso do fungo adicionado. A lavagem foi repetida por duas vezes.

Para a conservação das células foram adicionados 2 mL de formol a 10% em salina e a contagem das células que fagocitaram o fungo em relação às que não fagocitaram foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase.

Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância e comparação entre grupo *controle* e o grupo irradiado através do teste de Tukey, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Resultado da contagem total e diferencial das células do lavado peritoneal

O resultado da contagem total de células retiradas da cavidade peritoneal de camundongos demonstrou um aumento significativo no número de células do *controle* em relação aos animais inoculados com BCG i.p. ($p < 0,005$). O resultados da contagem diferencial das células do lavado peritoneal revelaram uma porcentagem estatisticamente igual entre mononucleares e polimorfo nucleares do grupo *controle* e do grupo inoculado com BCG i.p. (Tabela 1).

	Controle	Inoculado
Polimorfonucleares (PMN)	2%	10%
Mononucleares (MN)	98%	90%
Total (cel/mL)	$0,84 \times 10^6$ ($\pm 0,34$)	$1,7 \times 10^6$ ($\pm 0,27$)

Tabela 1: Contagem total e porcentagem diferencial das células do lavado peritoneal.

Resultado da ação da luz polarizada sobre a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais.

Os gráficos 1,2 e 3 mostram os resultados da ação

da luz polarizada nas cores azul, verde e vermelha sobre a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais ativados com BCG e células controle, sendo que os dados são referentes a 1 experimento, cada um deles feito em quadruplicata e com os resultados repetidos.

O gráfico 1 apresenta a porcentagem de células inflamatórias que fagocitaram o fungo *Saccharomyces Cerevisiae*. Avaliando os valores obtidos dos grupos *controle* e *controle luz vermelha* (C. Luz), observamos que a diferença não foi estatisticamente significativa. Quanto aos grupos *inoculado* e *inoculado luz vermelha* (I. Luz), notamos que as diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

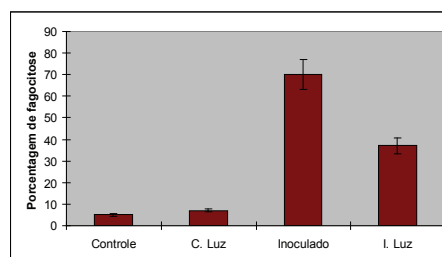


Gráfico 1: Ação da luz polarizada vermelha sobre o índice fagocítico de macrófagos peritoneais ativados com BCG i.p. ou células controle

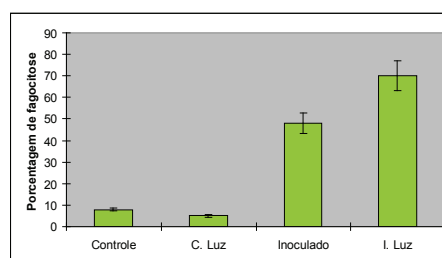


Gráfico 2: Ação da luz polarizada verde sobre o índice fagocítico de macrófagos peritoneais ativados com BCG i.p. ou células controle.

O gráfico 2 é referente à porcentagem fagocítica de macrófagos peritoneais murinos ativados ou não com a inoculação i.p. de BCG. Avaliando os valores obtidos dos grupos Controle e Controle luz verde (C.Luz), observamos que a diferença não foi estatisticamente significativa. Quanto aos grupos Inoculado e Inoculado luz verde (I. Luz), notamos que as diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

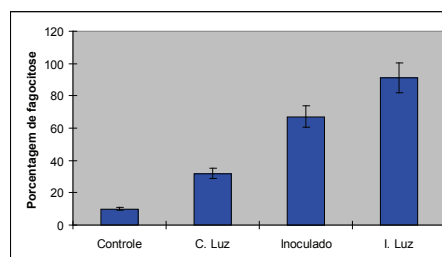


Gráfico 3: Ação da luz polarizada azul sobre o índice fagocítico de macrófagos peritoneais ativados com BCG i.p. ou células controle.

No gráfico 3 observa-se a porcentagem de fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos. Avaliando os valores obtidos dos grupos Controle e Controle luz azul (C. Luz), observamos que a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,04$). Quanto aos grupos Inoculado e Inoculado luz azul (I. Luz), notamos que as diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Desde os primórdios da história humana, a luz é objeto de adoração e sua expressão associada à vida sempre foi utilizada. Suas funções terapêuticas, no entanto, sempre foram observadas desde os egípcios e gregos, mas sua ação foi estudada de forma mais intensa a partir do século XVIII. A ação das cores também é objeto de estudo nas áreas do comportamento humano, onde se correlacionam as cores utilizadas e sua expressão acerca da impressão do indivíduo no momento do contato com elas. Até mesmo a escolha de cores para as roupas podem refletir o estado emocional de seu usuário. Áreas da psicologia, como a ludoterapia, utilizam as cores escolhidas por uma criança que, ao pintar um desenho, traduz dados acerca de seu estado psíquico, uma vez que esta não consegue se expressar para o terapeuta.

Devemos considerar também que nosso corpo não sobreviveria sem a presença da luz, pois inúmeras substâncias são cromóforas, dependentes da luz para executarem suas funções bioquímicas. Sendo assim, é difícil não imaginar que a luz não deva exercer outras ações biológicas sobre tecidos humanos. Em nosso trabalho, irradiamos macrófagos peritoneais de camundongos ativados ou não com a inoculação i.p. de BCG com diferentes espectros de luz. Os resultados demonstraram que a luz azul e a verde estimulam a capacidade fagocítica dos macrófagos, enquanto a luz vermelha inibe essa ação.

Considerando-se os experimentos realizados em animais de laboratório¹⁵, que serviram de base para este trabalho, a luz azul foi irradiada em animais com melanoma inoculado e, dez dias depois, foi observada a produção de metástases pulmonares. Com a irradiação luminosa azul observou-se uma inibição da atividade celular em melanócitos, o que leva a crer na ocorrência de uma diminuição metabólica desse grupo celular. Ao utilizarmos os mesmos padrões em células mononucleares, imaginamos que o resultado esperado seria no mínimo parecido. No entanto, viu-se exatamente o contrário: em células mononucleares a luz polarizada azul gera uma ativação celular com aumento dos índices fagocíticos. O mesmo ocorre também com a luz verde, mas com um índice menor que o azul.

A irradiação vermelha mostrou uma ação inibitória na fagocitose dos macrófagos, sendo esse resultado contrário às outras duas irradiações luminosas. Esses resultados sugerem que as células mononucleares apresentam comportamento distinto dependendo do

espectro de luz utilizado.

Outra observação importante é que, em relação ao comprimento de onda dessas três cores no espectro de luz visível, o macrófago parece se ativar com comprimentos de onda menores (luz azul) em relação aos maiores (luz vermelha).

Ao compararmos esses resultados com os obtidos por Ohara et al.¹⁵, notamos também que os grupos celulares apresentam comportamentos diferentes, com diferentes espectros de luz irradiada. Uma determinada célula pode apresentar reações diferenciadas em relação à outra célula submetida à mesma irradiação luminosa. Assim sendo, estudos adicionais devem ser realizados para a total compreensão dos efeitos que a luz em seus mais variados espectros pode exercer sobre a saúde de seres humanos, como para colaborar na prevenção e no tratamento das mais variadas patologias humanas.

CONCLUSÃO

No trabalho apresentado concluímos que a luz polarizada nas cores azul e verde estimulam a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais murinos, enquanto a luz vermelha inibe essa atividade celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farias JL de. Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
2. Busund SR. The biology of macrophage: II inflammation and tumors. Eur J Hematol. 1994; 52:1-12.
3. Roitt I, Brostoff J, Male D. Imunologia. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2003.
4. Naito M, Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umez H, Hasegawa G, et al. Development differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophage. J Leukoc Biol. 1996; 59:133-8.
5. Bosque F, Belkaid Y, Briend E, Hevin B, Lebastard M, Soussi N, et al. The biology of Macrophage. Path Biol. 1997; 45:103-9.
6. Papadimitriou JM, Ashman RB, Macrophage: current views on their differentiation, structure, and function. Ultras Path. 1989; 13:343-372.
7. Gordon S, Clarke S, Greaves D, Doyle A. Molecular immunobiology of macrophage: recent progress. Curr Opin Immunol. 1995; 7:24-33.
8. Ding AH, Nathan CF, Sturt DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activation cytokines and evidence for independent production. J Immunol. 1988;141:2407-12.
9. Grupo de Reelaboração do Ensino da Física – GREF. Óptica. Física 2: física térmica, óptica. 5ª ed. São Paulo: EDUSP, 2005.
10. Pérez AR, Gómez JAA. Uso terapéutico del color como método tradicional. Rev Cub Enf. 2001;3(17):163-7.
11. Gerber R. Medicina Vibracional: uma Medicina para o Futuro. 14ª edição. São Paulo: Cultrix, 2004. 228p.
12. Walker M. El poder del color. El arte y la ciencia de curar utilizando los colores. Buenos Aires: Ediciones Arkano Books; 1998.
13. Goodman R. Yantrología. Las sorprendentes propiedades curativas de la luz. Cromoterapia. Barcelona: Editorial RED; 1994.
14. Weiss JM, Chavelli. La curación por los colores. Barcelona: Ediciones Robin Book; 1995.
15. Ohara M, Kobayashi M, Fujiwara H, Kitajima S, Mitsuoka C, Watanabe H. Blue light inhibits melanin synthesis in B16 melanoma 4A5 cells and skin pigmentation induced by ultraviolet B in guinea-pigs. Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine. 2004;20(2):86-92.