



EFEITOS DA LUZ SOBRE A POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS

Palavras-Chave: FOTOBIMODULAÇÃO, MACRÓFAGOS, iNOS, IMUNOMODULAÇÃO, IRRADIAÇÃO

Autores(as):

DÉBORAH CORREIA OLIVEIRA, IFGW – UNICAMP

Dr^a ALINE SIQUEIRA BERTI, IB – UNICAMP

Prof. Dr. HERNANDES F. CARVALHO (orientador), IB – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Os macrófagos, células essenciais do sistema imunológico, desempenham um papel central na resposta inflamatória e na mediação de diversos processos regenerativos. Sua plasticidade e amplas funções os tornam fundamentais em todas as fases do reparo tecidual. Seus efeitos dependem dos estímulos presentes no microambiente, os quais determinam sua polarização em diferentes fenótipos. De acordo com esses estímulos, os macrófagos podem ser polarizados em macrófagos classicamente ativados (“fenótipo M1”), associados a respostas pró-inflamatórias e efeitos citotóxicos, ou em macrófagos alternativamente ativados (“fenótipo M2”), com perfil anti-inflamatório e pró-resolutivo [1].

Nas fases iniciais do processo inflamatório, os macrófagos predominantes são classicamente ativados. Este fenótipo é caracterizado pela produção de citocinas e marcadores inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A expressão de iNOS leva à produção de óxido nítrico (NO), uma molécula com efeitos citotóxicos que auxilia na eliminação de patógenos e células danificadas [1-4]. Com a progressão do reparo tecidual, os macrófagos no local da lesão transitam para um perfil anti-inflamatório, que atenua os efeitos dos macrófagos produtores de NO, secretando citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, estimulando a reconstrução do tecido danificado e contribuindo para a resolução da inflamação.

A complexidade e a importância dos diferentes fenótipos de macrófagos no processo de reparo tecidual sugerem que essas células podem ser alvos para intervenções terapêuticas. Nesse contexto, a fotobimodulação (PBM), também conhecida como terapia com luz de baixa intensidade, tem sido investigada como uma ferramenta para acelerar o reparo tecidual. A PBM utiliza fontes de luz não ionizantes, como lasers e diodos emissores de luz (LEDs), nos espectros visível e infravermelho próximo para modular a atividade biológica em nível celular e tecidual.

A escolha dos parâmetros de irradiação, como o comprimento de onda e a intensidade da luz, pode resultar em diferentes respostas biológicas. Porém, o mecanismo pelo qual a luz influencia essas

células ainda não é bem elucidado. Neste trabalho, investigamos os efeitos da luz visível (azul, vermelha, amarela e verde) sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7 previamente polarizados para os fenótipos M0, M1 e M2, com foco na expressão de iNOS, a fim de observar a influência da luz como modulador da resposta imune.

METODOLOGIA:

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio DMEM High Glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótica (penicilina/estreptomicina), sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C de acordo com as recomendações da ATCC. Após atingirem confluência ideal, as células foram semeadas em placas de 24 poços, com densidade de aproximadamente 50 mil células por poço. No dia seguinte ao plaqueamento, foram aplicados os tratamentos para indução da polarização dos macrófagos. Para a polarização do fenótipo pró-inflamatório foi utilizada a combinação de 100 ng/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e 20 ng/mL de interferon-gama (IFN- γ). Para a indução do fenótipo anti-inflamatório foram utilizadas 20 ng/mL interleucina-4 (IL-4). Os poços destinados ao fenótipo M0 (macrófagos não ativados) permaneceram sem qualquer estímulo. Após 24 horas de incubação com os tratamentos, a irradiação dessas células foi realizada. Foram utilizadas cinco placas de 24 poços. Quatro dessas placas foram destinadas à irradiação com luz visível de diferentes cores: azul, vermelha, amarela e verde. Cada uma dessas placas continha apenas 6 poços utilizados, organizados em três duplas, sendo: uma dupla com macrófagos M0, uma com macrófagos classicamente ativados e uma com macrófagos alternativamente ativados. As duplas foram dispostas com espaçamento entre elas para minimizar a interferência luminosa entre os poços. A quinta placa foi utilizada como controle não irradiado e foi organizada da mesma forma, mas continha um poço adicional utilizado como controle negativo da imunomarcagem.

A irradiação foi realizada utilizando uma lanterna LED de luz branca acoplada a filtros ópticos de forma a selecionar a cor desejada. A lanterna foi posicionada a uma distância de 2 cm das células, de modo a irradiar uma área aproximada de 1 cm². A intensidade da luz foi medida previamente com um medidor de potência luminosa, e os tempos de exposição foram ajustados para fornecer uma dose de 3 J/cm². Cada placa foi irradiada separadamente para garantir o controle das condições de iluminação.

Aproximadamente 3 horas após a irradiação, as células foram fixadas e submetidas à imunofluorescência. A expressão de iNOS foi detectada utilizando anticorpo primário anti-iNOS (Cat. ab3523, ABCAM, Cambridge, UK) e anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 546. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI que identifica o DNA.

As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência e analisadas utilizando o software ImageJ. Para cada poço, três imagens foram capturadas, totalizando 18 células analisadas por poço e, portanto, 36 células por fenótipo. A quantificação de fluorescência de cada célula foi obtida através da média de sua intensidade. Após isso, esses dados foram analisados estatisticamente no software GraphPad Prism utilizando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Inicialmente, a análise entre os grupos não irradiados foi feita para validar o modelo experimental. Observou-se um aumento significativo na intensidade de marcação de iNOS nos macrófagos classicamente ativados em comparação com os macrófagos M0, o que era esperado, visto que a iNOS é o principal marcador deste fenótipo [5]. Já os macrófagos alternativamente diferenciados não apresentaram aumento no conteúdo de iNOS em comparação com o grupo M0, de acordo com o esperado para seu perfil de supressor de vias pró-inflamatórias (Figura 1).

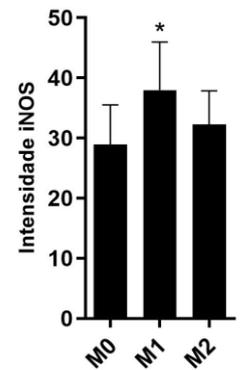


Figura 1: Expressão de iNOS no grupo controle.

A irradiação dos macrófagos M0 resultou em aumento significativo da expressão de iNOS nas condições de luz amarela, vermelha e verde em comparação ao grupo M0 controle (Figura 2a). Esses resultados sugerem que determinados comprimentos de onda da luz visível podem promover a ativação de vias inflamatórias em macrófagos não polarizados, direcionando-os para um perfil semelhante ao classicamente ativados.

De forma contrastante, a irradiação com luz vermelha, azul e verde sobre macrófagos já ativados

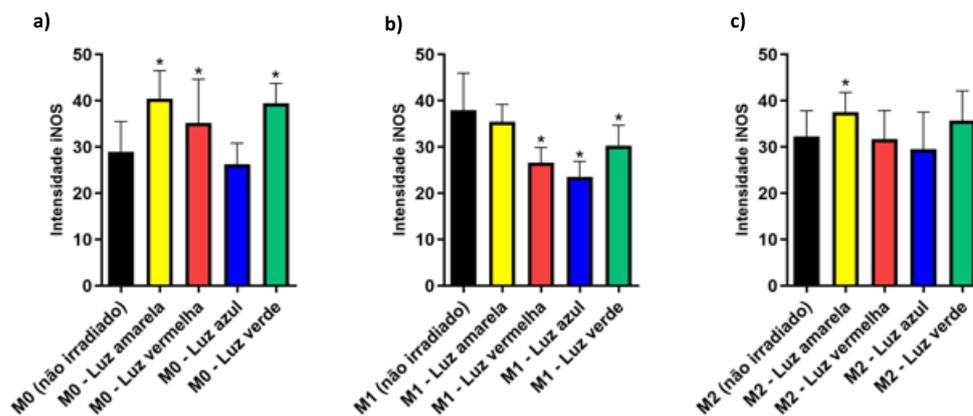


Figura 2: Expressão de iNOS para os fenótipos M0, M1 E M2 respectivamente, quando irradiados.

por LPS promoveu uma redução significativa na intensidade de marcação para iNOS (Figura 2b). Este efeito anti-inflamatório é um dos desfechos mais documentados da PBM. O resultado obtido com a luz vermelha está em conformidade com o estudo de Fernandes et al [2] que demonstraram uma redução na expressão de iNOS em macrófagos ativados após irradiação com laser de 660 nm (luz vermelha). Pode ser que esse efeito se estenda a outros comprimentos de onda, como os resultados sugerem.

Por fim, os macrófagos diferenciados pelo tratamento com IL-4 irradiados com luz amarela apresentaram aumento significativo na expressão de iNOS em comparação ao grupo controle, enquanto as outras luzes não promoveram alterações (Figura 2c). Este resultado aponta para a possibilidade de uma "repolarização" alternativamente ativados para um estado pró-inflamatório sob estímulos luminosos específicos.

Considerando o espectro das luzes utilizadas, é possível propor que os efeitos observados sobre a intensidade de marcação de iNOS possam estar relacionados ao modo como diferentes comprimentos

de onda interagem com alvos celulares específicos, como citocromos ou outros cromóforos presentes na mitocôndria. A luz vermelha, por exemplo, mostrou perfil dual: aumentando o conteúdo de iNOS em M0 e reduzindo-o em macrófagos previamente diferenciados no perfil pró-inflamatório, o que reforça a ideia de que o estado de ativação da célula pode também modular a resposta à irradiação.

Este estudo concentrou-se em um único marcador pró-inflamatório (iNOS). A inclusão da análise de marcadores como a Arginase-1 (típica do perfil de ativação alternativa, forneceria uma visão mais completa dos efeitos da luz sobre a polarização dos macrófagos. Adicionalmente, a quantificação da expressão gênica por RT-qPCR complementaria os dados de imunofluorescência, oferecendo uma análise mais robusta.

CONCLUSÕES:

Os resultados deste trabalho demonstram que a fotobiomodulação com luz visível, a uma dose de 3 J/cm², afeta a quantidade da enzima iNOS por célula de forma variável, dependendo da cor da luz e do estado de ativação da célula. Conclui-se que a luz visível pode ter um papel duplo na resposta imune, agindo como ativador pró-inflamatório em macrófagos M0 (com luz amarela, vermelha e verde) e como agente anti-inflamatório em macrófagos classicamente ativados (com luz vermelha, azul e verde). A luz amarela se destacou por seu efeito consistentemente pró-inflamatório, aumentando a iNOS tanto em células M0 quanto em células diferenciadas pelo tratamento com IL-4.

Os resultados, embora preliminares, mostram que a interação entre a luz e as células imunes é complexa, pois o efeito depende tanto da cor da luz quanto do estado de ativação do macrófago. Isso indica que o uso terapêutico da fotobiomodulação (PBM) exige uma escolha cuidadosa dos parâmetros a serem utilizados. Para entender melhor esses mecanismos e confirmar nossos resultados, mais estudos são necessários. Análises futuras devem incluir outros marcadores como a Arginase-1, e técnicas mais robustas como o RT-qPCR, para validar o potencial da luz no controle preciso da resposta imune.

BIBLIOGRAFIA

1. MOSSER, David; EDWARDS, Justin. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
2. FERNANDES, Kristianne et al. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. **Photochem. Photobiol**, v. 153, p. 344-351, 2015.
3. LI, Kun et al. Attenuation of the inflammatory response and polarization of macrophages by photobiomodulation. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 35, p. 1509-1518, 2020.
4. TIAN, Tian et al. Photobiomodulation activates undifferentiated macrophages and promotes M1/M2 macrophage polarization via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Lasers in Medical Science**, Londres, v. 38, p. 86, 2023.

5. KETZ, Ann et al. Characterization of Macrophage/Microglial Activation and Effect of Photobiomodulation in the Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, Oxford, v. 18, p. 932-946, 2017.