

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

ANTONIETA MARQUES CALDEIRA ZABEU

**VIABILIDADE CITOTOXICIDADE PRÉ E PÓS-TRATAMENTOS DE
CÉLULAS SH-SY5Y COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

**SÃO JOSÉ DOS CAMPOS – SP
2022**

ANTONIETA MARQUES CALDEIRA ZABEU

**VIABILIDADE CITOTOXICIDADE PRÉ E PÓS-TRATAMENTOS DE
CÉLULAS SH-SY5Y COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Zabeu, Antonieta Marques Caldeira
viabilidade citotoxicidade pré e pós-tratamentos de células
sh-sy5y com laser de baixa intensidade / Antonieta Marques
Caldeira Zabeu; orientador, Prof. Dr. Newton Soares da Silva. -
São José dos Campos, SP, 2022.
1 CD-ROM, 69 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José
dos Campos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Fotobiomodulação. 3. Células
SH-SY5Y. 4. Citotoxicidade. I. Silva, Prof. Dr. Newton Soares da,
orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Antonieta Marques Caldeira Zabeu, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 13 de Junho de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 12/04/2022

ANTONIETA MARQUES CALDEIRA ZABEU

**“VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE PRÉ E PÓS-TRATAMENTO DE CÉLULAS SH-SY5Y
COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.ª DR.ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA

PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA

PROF.ª DR.ª CRISTINA PACHECO SOARES

PROF. DR. ALESSANDRO EUSTAQUIO CAMPOS GRANATO - USP

PROF.ª DR.ª SÓNIA TEIXEIRA FRAGA – INSA, PORTO, Portugal

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 12 de abril 2022.

Dedicatória

Ao meu pai Diorcil Marques Caldeira (*in memoriam*), me ensinou que o amanhã é sempre diferente, sempre melhor que o hoje.

Agradecimentos

Às minhas filhas Amanda e Bárbara, são meu porto seguro;

Ao Clayton, meu esposo, que apoiou esta caminhada;

À minha mãe Eloisa, mulher forte que amo e admiro;

Ao professor Newton Soares da Silva por me acolher e acreditar no meu trabalho;

À profa. Dra. Cristina Pacheco Soares por disponibilizar as instalações de seu laboratório para a execução deste projeto;

As minhas “*amiguinhas do lab*”, Rafaella, Amanda e Mariela que, além da amizade, foram fundamentais para realização dos meus experimentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação Vale Paraibano de Ensino – FVE, por todo o apoio recebido.

Aos muitos profissionais que fizeram parte do meu caminho nesta jornada do doutorado.

“Comece por fazer o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, estará a fazer o impossível.”

São Francisco de Assis

ZABEU, Antonieta Marques Caldeira. **Viabilidade citotoxicidade pré e pós-tratamento de células SH-SY5Y com laser de baixa intensidade**. 2022. 68f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2022.

RESUMO:

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a demência poderá afetar 75 milhões de pessoas em 2030, podendo chegar a 132 milhões em 2050. A demência caracteriza-se pela perda gradual da memória e outras habilidades cognitivas que prejudicam a execução de ações básicas diárias dos indivíduos acometidos, sendo os mais conhecidos a Demência Vasculare, Demência com Corpos de Lewy, mal de Parkinson, e a Doença de Alzheimer (DA), a qual sozinha corresponde a 60 – 90 % dos casos de demência. A ciência, atualmente, já tem medicamentos eficientes que retardam o processo degenerativo e outras terapias também são utilizadas para coibir a progressão da neurodegeneração, dentre estas, há a fotobiomodulação. Os efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos da Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) ou Diodo emissor de luz (LED) mostram-se eficientes na prevenção e retardo de processos degenerativos. No presente trabalho, busca-se avaliar o comportamento da célula SH-SY5Y, modelo celular para estudos de doenças degenerativas como DA, frente à irradiação com TLBI e observar alterações ocorridas quanto à viabilidade celular, atividade mitocondrial e citotoxicidade. As células foram irradiadas com laser de baixa intensidade (830 nm, 200 mW, *spot size* 0,1075 cm², modo contínuo) com energias de 1, 5, 10, 15 e 20 J, em sequência, foram induzidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio e tratadas com TLBI pré e pós-estresse. As avaliações foram feitas pelo ensaio com Cristal Violeta, potencial de membrana mitocondrial, teste MTT, e ensaio de exclusão de células inviáveis pelo azul de tripano para avaliação de citotoxicidade. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por ANOVA Two-way e pós-teste de Tukey. Os resultados obtidos, dentro das condições experimentais e dos parâmetros pré-estabelecidos para o LBI, indicam que foi biomodulador o efeito da fototerapia para a viabilidade celular, não ocorreu morte celular por efeito citotóxico e houve ativação mitocondrial. Conclui-se que dentro das condições experimentais e dos parâmetros pré-estabelecidos para o LBI, as doses de energia entregues ao modelo celular SH-SY5Y que tiveram melhor interação foram 5, 10 e 15 J.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; LBI; SH-SY5Y; Viabilidade, Citotoxicidade.

ZABEU, Antonieta Marques Caldeira. **Viability cytotoxicity pre and post-treatment of SH-SY5Y cells with low intensity laser**. 2022. 68f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2022.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), dementia could affect 75 million people in 2030, reaching 132 million in 2050. Dementia is characterized by the gradual loss of memory and other cognitive abilities that impair the execution of tasks. basic daily actions of affected individuals, the best known being Vascular Dementia, Dementia with Lewy Bodies, Parkinson's disease, and Alzheimer's Disease (AD), which alone accounts for 60 - 90% of dementia cases. Science currently has efficient drugs that slow down the degenerative process and other therapies are also used to curb the progression of neurodegeneration, among which is photobiomodulation. The photophysical, photochemical and photobiological effects of Low Intensity Laser Therapy (LLLT) or Light Emitting Diode (LED) are shown to be efficient in preventing and delaying degenerative processes. In the present work, we seek to evaluate the behavior of the SH-SY5Y cell, a cellular model for studies of degenerative diseases such as AD, in the face of irradiation with LLLT and to observe changes in cell viability, mitochondrial activity and cytotoxicity. The cells were irradiated with low intensity laser (830 nm, 200 mW, spot size 0.1075 cm², continuous mode) with energies of 1, 5, 10, 15 and 20 J, in sequence, they were induced to oxidative stress by peroxide of hydrogen and treated with pre- and post-stress LLLT. Evaluations were performed by Crystal Violet assay, mitochondrial membrane potential, MTT test, and trypan blue nonviable cell exclusion assay for cytotoxicity assessment. Statistical analyzes of the results were performed by Two-way ANOVA and Tukey's post-test. The results obtained, within the experimental conditions and parameters pre-established for LLLT, indicate that the effect of phototherapy on cell viability was biomodulatory, there was no cell death due to cytotoxic effect and there was mitochondrial activation. It is concluded that within the experimental conditions and parameters pre-established for the LLLT, the energy doses delivered to the SH-SY5Y cell model that had the best interaction were 5, 10 and 15 J.

Keywords: Photobiomodulation; LLLT; SH-SY5Y; Viability, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Múltiplos mecanismos da LBI na célula nervosa.....	21
Figura 2 - Plaqueamento intervalado, a fim de evitar a interferência da irradiação depositada entre os poços cultivados com células; e modo de irradiação de cada poço.	26
Figura 3 - Equipamento Laser Check (MMO®), utilizado para verificação da potência nominal do equipamento de laserterapia.	28
Figura 4 - Aparato de fixação da probe do equipamento de laserterapia em contato com a placa para ser irradiada.	28
Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular através do teste de CV frente ao LBI.....	33
Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular pelo teste CV, pré-tratamento com LBI seguido de indução do estresse oxidativo na cultura de células.	35
Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular pelo teste CV, indução do estresse oxidativo na cultura de células seguido pelo tratamento com LBI.	36
Figura 8 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo MTT frente ao LBI.....	37
Figura 9 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste MTT, pré-tratamento com LBI seguido de indução do estresse oxidativo na cultura de células.	39
Figura 10 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste MTT, indução do estresse oxidativo na cultura de células seguido pela LBI.....	41
Figura 11 – Imagem de microscopia de fluorescência (confocal) a) controle; b) 1J; c) 5 J; d) 10 J; e) 15 J; f) 20 J. As setas indicam as mitocôndrias filamentosas pelo aumento da atividade mitocondrial.	42
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do LBI em células SH-SY5Y pelo teste Azul de Tripano.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais e energias depositadas.....	27
Tabela 2 – Parâmetros do LBI	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AsGaAl	Arseneto, Gálio e Alumínio
ATP	Adenosina Trifosfato
A β	Proteína β -amiloide
CO ₂	Dióxido de Carbono
COC	Citocromo C Oxidase
CV	Cristal Violeta
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	(diamidino-2-phenylindole)
DCC	Disfunção Cognitiva Canina
DE	Densidade de Energia
DMEM/F12	<i>Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture</i> (Meio de Eagle Modificado da Gibco Dulbecco: Mistura de Nutrientes)
DMSO	Dimetilsufóxido
DP	Densidade de Potência
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HANK'S	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i> (Solução Salina Equilibrada de Hanks)
HClO	Ácido Hipocloroso
J	Joule
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
LOO	Peroxila
MASER	<i>Microwave Amplification through Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação)
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio)
mW	Miliwatts
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBM	<i>Photobiomodulation therapy</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TLBI	Terapia a Laser de Baixa Intensidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CÉLULA NERVOSA EM PROCESSO DEGENERATIVO.....	16
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO NA CÉLULA NERVOSA.....	16
2.3	LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)	18
2.4	LBI E SISTEMA NERVOSO	19
3	JUSTIFICATIVA.....	23
4	OBJETIVO.....	24
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	CULTURA CELULAR.....	25
4.2	LBI.....	27
5.3	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA	29
5.4	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT.....	29
5.5	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR TESTE DE AZUL DE TRIPANO	29
5.6	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO TESTE DE MITOTRACKER	30
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
7	RESULTADOS	33
7.1	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA	33
7.2	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS PREVIAMENTE COM LASER SEGUIDO DE INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA	34
7.3	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, AS CÉLULAS FORAM PREVIAMENTE INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRATADAS COM LASER NA SEQUÊNCIA, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA.....	36
7.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE MTT	37
7.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM CULTURA DE CÉLULAS SH- SY5Y TRATADAS PREVIAMENTE COM LASER E INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, PELO TESTE MTT.....	39
7.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO TESTE MTT, AS CÉLULAS FORAM PREVIAMENTE INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRATADAS COM LASER NA SEQUÊNCIA.....	40

7.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE MITOTRACKER.....	42
7.8 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE AZUL DE TRIPANO	43
8 DISCUSSÃO.....	46
9 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - TRABALHOS EM CONGRESSOS	66
APENDICE B - ARTIGOS PUBLICADOS	67
i. Artigo publicado sob título “ <i>Biomodulatory effect of low intensity laser (830 nm.) in neural model 9L/lacZ</i> ” no periódico Research, Society and Development, DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17025	67
ii. Artigo publicado sob título “810 nm Low-intensity laser in the treatment of degenerative articular disease associated with kinesiotherapy and chondroprotectors – case report” no periódico Research, Society and Development, DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15494	67
iii. Artigo aceito para publicação em 16.02.22 sob título “ <i>Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio</i> ”, no periódico Research, Society and Development. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26474	67

1 INTRODUÇÃO

A saúde mental é essencial para compor o estado de saúde e bem estar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), “A saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não apenas a ausência de doenças.”. O que determina uma boa saúde mental, além das características individuais, são os fatores sociais, as condições de trabalho, o nível de escolaridade, a exposição às adversidades. Estes fatores podem influenciar no desequilíbrio mental ao longo da vida (SAXENA; SETOYA, 2014), bem como traumas e tumores cerebrais podem predispor ao aparecimento dos transtornos mentais na fase senil do indivíduo. Entre as doenças que afetam a saúde mental, temos os quadros de demência com maior prevalência. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), a demência poderá afetar 75 milhões de pessoas em 2030, podendo chegar 132 milhões em 2050 e a prevalência de pessoas com demência é maior nos países de baixa renda, baixa escolaridade e baixa qualidade de atendimento à saúde básica.

A demência caracteriza-se pela perda progressiva da memória e outras habilidades cognitivas que prejudicam a execução de ações básicas diárias dos indivíduos acometidos. Os quadros de demência são processos degenerativos progressivos, sendo os mais comuns a Demência Vascular que ocorre em função de má irrigação sanguínea do tecido neural e isso leva a morte celular. Por sua vez, na demência com Corpos de Lewy ocorre a deposição da proteína alfa – sinucleína dentro dos neurônios perturbando seu funcionamento, isso também está associado ao mal de Parkinson que também é enquadrada como um distúrbio mental. A demência frontotemporal caracterizada por lesões nos lobos frontais e a Doença de Alzheimer (DA) que sozinha corresponde a 60 – 90 % dos casos de demência (KNOPMAN *et al.*, 2021; LEI; AYTON; BUSH, 2021).

A ciência, atualmente, já tem medicamentos parcialmente eficientes que atuam para retardar o processo degenerativo, contudo há uma variação entre os indivíduos doentes quanto à aceitação dos medicamentos pelo organismo, há dificuldade no estabelecimento do diagnóstico, precoce e correto, pois a manifestação clínica pode ser confundida com sintomas inerentes à senilidade do paciente, por exemplo (ZANINI, 2010).

Também em animais, a clínica médica dos animais de companhia tem recebido em maior número cães que apresentam Disfunção Cognitiva Canina (DCC), uma síndrome neurodegenerativa similar à DA humana (NEUS BOSCH *et al.*, 2012). Em muitos casos, o

diagnóstico definitivo só ocorre no *post mortem*. Isso é reflexo do aumento da longevidade dos animais, melhor acesso aos cuidados de saúde e alimentação. Contudo, muitas vezes, este paciente já chega ao atendimento clínico com a doença em estágio avançado, associado a outras comorbidades e que dificulta a utilização de métodos diagnósticos mais preciso, como por exemplo, os exames de imagem por tomografia e ressonância magnética (MADARI *et al.*, 2015).

Há um esforço muito grande de toda comunidade médica e outros profissionais que atuam em saúde humana e animal para conter o avanço destes quadros de degeneração nervosa. Para humanos a ordem é atuar preventivamente, com manutenção da alimentação, manter corpo e mente ativos com exercícios dirigidos e acompanhados por profissionais. Para os cães, atividades físicas mescladas com atividades cognitivas e respeito às liberdades dos animais são fundamentais para a saúde desta espécie (MELLOR, 2016).

Dentre as terapias complementares que auxiliam no controle da progressão do processo degenerativo, há a fotobiomodulação do tecido neural com o Laser de Baixa Intensidade (LBI) e Diodos Emissores de Luz (LED). Esta terapia lumínica vem sendo utilizada em pacientes com doenças degenerativas crônicas, tal como DA e Parkinson, com grande sucesso e em quadros agudos de trauma crânio-encefálico e isquemias (LIEBERT; BICKNELL; ADAMS, 2014; XUAN *et al.*, 2013; BARRET; GONZALEZ-LIMA, 2013; MOREIRA *et al.*, 2011).

Dentre os processos degenerativos das células neurais, é patente que a degeneração ocorre por fatores que afetam a viabilidade celular, seja por ação tóxica de espécies reativas de oxigênio, pelo mal aporte de oxigênio (HUANG; YAN; ZHANG, 2020; HUANG *et al.*, 2020), pelo comprometimento vascular dos tecidos neurais. Assim, os efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos da Terapia á Laser de Baixa Intensidade (TLBI) ou LED mostram-se eficientes na prevenção e retardo de processos degenerativos (AHMED *et al.*, 2013). Neste estudo em desenvolvimento, busca-se avaliar o comportamento da célula SH-SY5Y sob estresse oxidativo, um importante processo patológico associado às doenças degenerativas como a DA, frente à irradiação com TLBI e observar alterações ocorridas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULA NERVOSA EM PROCESSO DEGENERATIVO

As doenças degenerativas têm origens multifatoriais. Na DA, por exemplo, a literatura sugere como uma das causas a “cascata amiloide” (SWERDLOW; BURNS; KHAN., 2010) em que ocorre a deposição da proteína Beta amiloide na célula nervosa ocasionando uma estase funcional e conseqüente morte celular. Também há anormalidades na proteína Tau que é abundante no tecido cerebral e é responsável pela manutenção dos microtúbulos das células (MACÊDO *et al.*, 2021). Além das deficiências destas proteínas importantes no metabolismo da célula neural, há a hipótese de defeitos bioenergéticos da célula, pelo funcionamento anormal da enzima Citocromo C oxidase (COC), também conhecido como complexo IV, da mitocôndria.

Esta enzima é responsável pela incorporação de elétrons ao final da cadeia respiratória na mitocôndria de modo a converter o oxigênio molecular completamente em moléculas de água. Assim, quando há qualquer perturbação, ao longo da cadeia respiratória, em que a redução de oxigênio aconteça com um número reduzido de elétrons, haverá a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) em excesso (MARTIN, 2012).

A produção aumentada das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) promove à morte celular programada da célula (apoptose) e em casos mais avançados a morte por necrose nos quadros de doenças degenerativas como o DA (SWERDLOW; PARKER, 1998).

Outro mecanismo envolvido na degeneração celular pode ser explicado pelo aumento da sinalização Ca^{2+} acumulado no retículo endoplasmático que ativa outros receptores e recrutam ainda mais Ca^{2+} dos estoques internos da célula (AGHOLME *et al.*, 2010; TORRÃO *et al.*, 2012).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA CÉLULA NERVOSA

Os radicais livres têm papel muito importante na origem da vida e evolução biológica: estão envolvidos em muitas atividades bioquímicas de células, como transdução de sinal, transcrição de genes e regulação da atividade da guanilato ciclase solúvel (MCCORD, 2000). Já é vasta a literatura (VAN MUISWINKLEL; KUIPERIJ, 2005; SINGH *et al.*, 2019;

DIONÍSIO; AMARAL; RODRIGUES, 2021; MAIURI *et al.*, 2019; ELFAWY; DAS, 2019) que evidencia que o estresse oxidativo é determinante em muitas doenças neurodegenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e de Parkinson. A degeneração neural que ocorre frente à bioquímica e patologia destas doenças coincide com vários marcadores de danos oxidativos.

Nos processos biológicos as células obtêm energia por meio de processos metabólicos oxidativos, que geram subprodutos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes óxidos têm curta duração, pois rapidamente os mecanismos de defesa celular atuam no sequestro, transformação e diminuição destas substâncias de modo que eles atuem no interior celular por curto período de tempo (UTTARA *et al.*, 2009). As células têm mecanismos que neutralizam os EROs de modo fisiológico, evitando assim, um desequilíbrio na homeostase celular e, conseqüentemente, a instalação do estresse oxidativo, que é prejudicial e leva a morte celular pelo mecanismo apoptótico (KLEIN; ACKERMAN, 2003). Dentre as ERO, têm-se radical hidroxila (OH), os superóxidos (O_2^-), peroxila (LOO) e alcoxila (LO), e os não radicais como oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre estes compostos EROs, alguns são altamente reativos comprometendo os lipídeos das membranas celulares, as proteínas de transcrição e o DNA celular. Outros podem não ser muito reativos, entretanto dão origem a outros compostos químicos danosos ao metabolismo celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ERO gerada como subproduto da atividade enzimática e o de oxidação que resulta na produção de radical hidroxila. O H_2O_2 tem importância fisiológica e patológica, pois é altamente difusível e pode atravessar a membrana plasmática (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Pode alterar vários mecanismos celulares, as funções de biomoléculas, inativação de enzima e oxidação de proteínas (SAKAGUCHI; MORI, 2020).

Diferentes estudos utilizam o H_2O_2 para induzir o estresse oxidativo (PARK *et al.*, 2015; NIRMALANDEVI *et al.*, 2014) no modelo celular SH-SY5Y (Neuroblastoma humano). Estes ensaios buscam elucidar o mecanismo de estresse oxidativo celular que está envolvido com o conceito de envelhecimento e de promoção e diferenciação celular. Os danos infligidos pelo acúmulo de EROs – endógenos ou exógenos – resultam em uma perturbação do equilíbrio oxidante-antioxidante existente nas células, inibindo os mecanismos de defesa que funcionam como antioxidantes (GILLE; JOENJE, 1992). A exposição da célula SH-SY5Y, *in vitro*, a

diferentes concentrações de H₂O₂ permite mimetizar os processos degenerativos de doenças neurais, e assim, buscar melhor compreensão do que ocorre nas células do sistema nervoso central, em condições *in vivo*, quando submetidas a um alto estresse oxidativo.

2.3 LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

O LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – caracteriza-se por ser uma luz monocromática, coerente e colimada. Einstein, em 1905, postulou que a luz é energia emitida em pacotes de fótons e, em 1953, Townes apresenta o primeiro equipamento, denominado MASER (*Microwave Amplification through Stimulated Emission of Radiation*) similar ao laser, pois emitia luz na forma de micro-ondas, mas não de forma coerente (MESTER; MESTER, 2017). Foi em 1960 que Maiman produz um equipamento que marca a história do laser como sendo o primeiro dispositivo com diodo de Rubi, que produz luz pulsada na ordem de milissegundos com comprimento de onda de 694,3 nm mono cristal de Safira, na região espectral do vermelho (KARU, 2010; BAXTER, 2009). Esta luz amplificada por emissão estimulada de radiação – Laser – desde 1960 vem sendo aplicada em diferentes segmentos: da indústria à medicina. O meio ativo do Laser pode ser um diodo semiconductor (AsGaAl), gás (CO₂), líquido ou cristais (rubi). São classificados em laser de baixa intensidade ou terapêuticos (até 500 mW) que apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (HENRIQUES; CAZAL; CASTRO., 2010) e lasers de alta potência ou cirúrgicos (acima de 1000 mW) com propriedades que permitem promover o corte de tecidos e vaporização (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017; HART, 2014).

Compreende os comprimentos de onda (λ) entre 400 a 700 nm, dentro do espectro de luz visível, e 700 a 1000 nm, infravermelho, não visível (KARU, 2010). O Laser de baixa intensidade (LBI), denominado de terapêutico, tem como principal ação a bioestimulação dos processos celulares por fotomodulação.

A terapia baseada em LBI tem sido descrita como uma alternativa de tratamento em diferentes processos inflamatórios (LINS *et al.*, 2010), degenerativos (WU *et al.*, 2009), reparo tecidual e proliferação celular (HASHIMI *et al.*, 2010a), entre outros, principalmente por não ser uma técnica invasiva. Estudos com diferentes linhagens celulares foram realizados para estabelecer os mecanismos de ação do laser quando aplicado *in vitro* ou *in vivo*, desde a década de 90.

Busca-se, com a terapia LBI, quando utilizada em tecidos ou extratos celulares, que os fótons sejam absorvidos pelas células ocasionando transformações em ações fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas, que resultam em efeitos positivos para o funcionamento da célula, sem causar danos térmicos.

Os resultados dos diferentes estudos mostram que um dos principais mecanismos de ação do laser na célula é o aumento da síntese de Adenosina Trifosfato (ATP), que incrementa a respiração celular e, conseqüentemente, a eficiência de todos os mecanismos celulares envolvidos na viabilidade das células (ORON *et al.*, 2007). Isso caracteriza a ação biomoduladora que pode ser observada pela proliferação celular, por exemplo.

Moore *et al.* (2005) concluíram em seus estudos com fibroblastos que tanto o comprimento de onda como o tipo celular influenciam na resposta obtida com a irradiação de Laser de baixa intensidade.

2.4 LBI E SISTEMA NERVOSO

Doenças degenerativas do sistema nervoso central, tais como esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, caracterizadas por uma progressiva perda de atividade dos neurônios motores, responderam positivamente à irradiação com laser de comprimento de onda de 810 nm, potência de 40 mW. A função motora do grupo irradiado foi significativamente melhor nos estágios iniciais da doença (WU *et al.*, 2012). Estudos com distúrbios de Alzheimer foram conduzidos com laser e demonstraram que houve a promoção da regulação da expressão do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) que é um marcador para a presença da doença (MENG; HE; XING, 2013).

Após a terapia com LBI, a célula irradiada sofre ação da energia depositada de tal forma que ocorre um efeito biomodulador, o qual pode ser positivo – estimulando a proliferação celular – ou negativo – levando à morte celular por apoptose ou necrose. Estudos sustentam que após a irradiação com LBI em células do sistema nervoso, há uma transmissão de informações neurais pela modulação dos canais iônicos, tanto pela ação direta nos fotorreceptores celulares (Citocromo C oxidase), como pela ação indireta por meio da modulação de enzimas (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013).

Rochkind *et al.* (2010) comprovaram em seus estudos com células embrionárias de cérebro que, após a irradiação com laser de comprimento de onda em 780 nm, houve surgimento acelerado de fibras de células neuronais interligadas. Adicionalmente, Oron e colaboradores (2007) demonstraram elevação de ATP celular, 10 minutos após a irradiação com $0,05 \text{ J/cm}^2$, em cultura de células neuronais quando comparados os grupos controle com grupos irradiados, da mesma cultura celular.

Giuliani *et al.* (2009) trabalharam com laser na região do visível, λ 670 nm e, mesmo na dose mais baixa utilizada em seu protocolo ($0,45 \text{ mJ/cm}^2$), promoveu uma proteção aos axônios.

Estudos mostram a eficiência da TLBI na recuperação de pacientes com quadros neurológicos resultantes de acidente vascular cerebral, após 2 ou 4 semanas do trauma, promovendo a neurogênese (GIULIANI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2015).

Estudos já esclareceram e comprovaram a eficiência do TLBI na bioestimulação de células tronco e em culturas de neurônios corticais primários. Outras investigações científicas buscam na luz a estimulação para células tronco neuronais, entre associação do TLBI com a implantação das células tronco no reparo de injurias no Sistema Nervoso Central.

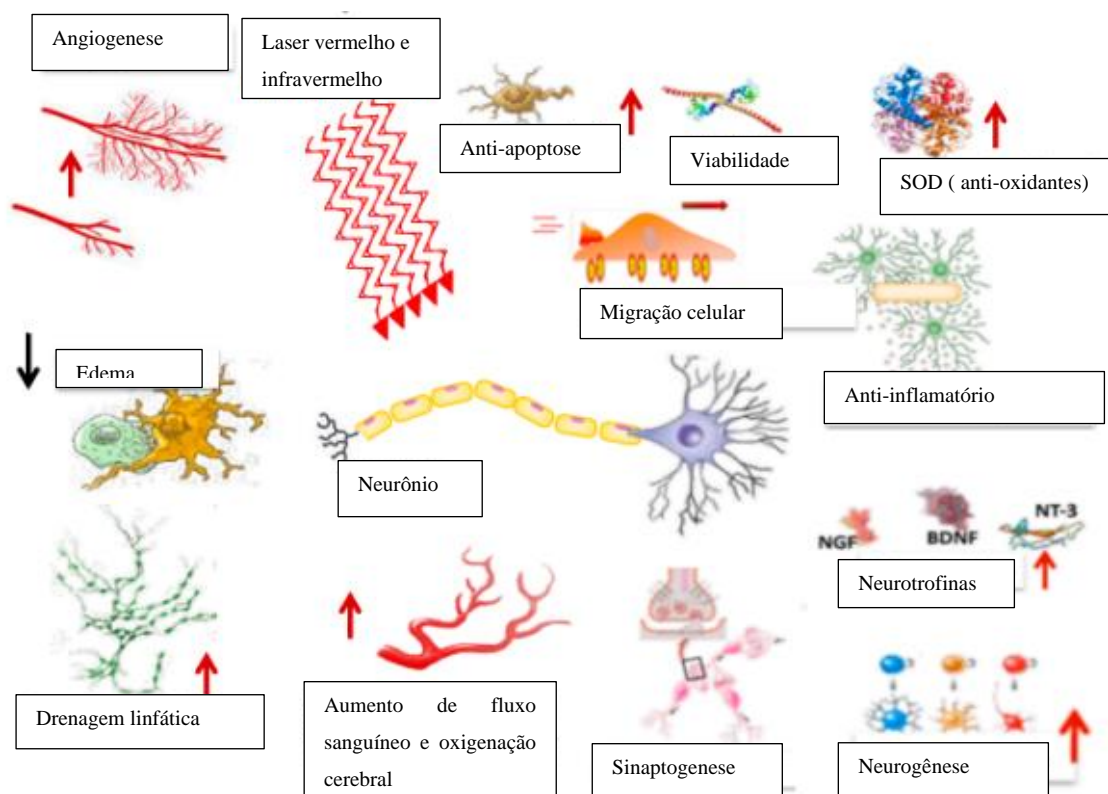
O traumatismo craniano, distúrbio que leva a graves complicações neurológicas, também pode beneficiar-se da TLBI, mesmo se a aplicação do laser ocorrer horas após o evento inicial (HASHIMI *et al.*, 2010b). Moreira *et al.* (2011), em sua pesquisa na qual avaliam o efeito do laser sob o aspecto anti-inflamatório e de reparo tecidual (780 nm, 40 mW, 3 J/cm^2 , 3 segundos) em traumatismo criogênico do sistema nervoso central, encontraram, nas primeiras 6 horas após trauma, o melhor efeito-resposta da laserterapia na prevenção de morte neuronal e da astrogliose severa. Este achado também é relatado nas pesquisas de Lapchak *et al.* (2010).

Corroborando com achados descritos acima, Xuan *et al.* (2013), também relatam que o uso de luz em 810 nm, modo contínuo, 25 mW/cm^2 , 18 J/cm^2 , irradiação iniciada 4 horas após trauma crânio-encefálico em ratos, promoveu a neurogênese.

Como a terapia baseada em LBI é não invasiva, sua utilização em aplicações transcraniais vem sendo estudada no tratamento auxiliar e imediato, nos quadros de traumatismo craniano, onde há uma rápida degeneração das células do sistema nervoso central, ocorrendo uma rápida morte celular (HAMBLIN, 2017). A estimulação cerebral com TLBI pode modular a função neurobiológica e induzir um efeito neuroterapêutico de forma não destrutiva e não térmica. Sua atuação na Citocromo C oxidase da célula neuronal, de maneira

estimuladora, incrementa a fisiologia neuronal (Figura 1). A fototerapia controla os danos cerebrais, prevenindo a morte neuronal e a astrogliose (MOREIRA *et al.*, 2011; HAMBLIN, 2019).

Figura 1 - Múltiplos mecanismos da LBI na célula nervosa.



Fonte: Adaptado de Hamblin (2019).

Mochizuki-Oda *et al.* (2002) mostram em sua pesquisa a comparação de resultados obtidos na irradiação direta em cérebros de ratos, em dois comprimentos de onda, 830 nm e 652 nm, ambos com densidade de potência de $4,8 \text{ W/cm}^2$, operando em modo contínuo. Notaram diferenças significativas no incremento do ATP, sendo o laser com comprimento de onda de 830 nm mais eficiente na promoção do ATP em relação ao de 652 nm.

Moore *et al.* (2005) mostram que diferentes tipos celulares interagem diferentemente com os comprimentos de onda. Citam, por exemplo, os fibroblastos que respondem melhor no vermelho (aproximadamente 660 nm), tendo seu crescimento inibido no infravermelho (aproximadamente 810 nm). Outras pesquisas (VON LEDEN *et al.*, 2013; MURAYAMA *et al.*, 2012; YAZDANI *et al.*, 2012) relatam nos seus resultados que as células neuronais,

interagem melhor com os comprimentos de onda no infravermelho. Ainda, experimentos conduzidos com infravermelho relatado pelos autores Murayama *et al.* (2012) (que utilizou 808 nm; 30 mW com densidades de 18, 36 e 54 J/cm²), Von Leden *et al.* (2013) (utilizou 808 nm, 50 mW e densidades de 0,2; 4, 10 e 30 J/cm²) e Abrahamse *et al.* (2010) (utilizou equipamento nos comprimentos de onda de 680 e 830 nm, 35 mW e densidades de 5, 10 e 15 J/cm²) mostram em seus resultados que a proliferação celular é dependente da fluência, que quando muito aumentada ela promove um efeito contrário inibindo a proliferação celular.

Karu, Pyatibrat e Kalendo (1995) descrevem o aumento do ATP em cultivos células HeLa, e que o aumento das respostas celulares dependem da fase proliferativa em que a célula está demandando um maior ou menor consumo energético.

Gao e Xing (2009) indicaram, em sua revisão, que diferentes estudos executados demonstraram que o laser promove o aumento e/ou a expressão de diferentes proteínas envolvidas no processo do ciclo celular, tal como as Ciclinas D1, E e A, entre outras. O LBI, ao interagir diretamente com a enzima citocromo C oxidase presente na mitocôndria das células, leva à estimulação da produção do ATP celular. Assim a célula com maior aporte energético passa a trabalhar de maneira mais eficiente, melhorando seus mecanismos de defesa e proliferativo.

Na revisão de literatura, observou-se que as células neuronais podem beneficiar-se da TLBI, sendo os comprimentos de onda dentro do espectro do infravermelho os mais adequados para este tipo celular. Ainda, não se mostra claramente qual o melhor modo de entrega da energia e fluências empregadas. Diante destas conclusões obtidas na revisão de literatura, escolheu-se empregar no presente estudo o comprimento de onda de 830 nm, operando em modo contínuo, e as energias de 1, 5, 10, 15 e 20 J para seu modelamento experimental.

3 JUSTIFICATIVA

Há, na literatura, diversos resultados da ação do LBI e LED em muitos tecidos *in vivo* e em modelos celulares *in vitro*, dentro da janela terapêutica, compreendida no espectro de luz visível e invisível (600 – 1100 nm). Acredita-se que a interação da luz com as mitocôndrias amplifica a atividade mitocondrial e conseqüentemente os processos celulares dependentes da produção de ATP (adenosina trifosfato). A linhagem celular SH-SY5Y é utilizada como modelo experimental de pesquisas *in vitro* na busca de um melhor entendimento das manifestações que ocorrem nas células nos processos neurodegenerativos (KOVALEVICH; SANTERRE; LANGFORD, 2021); o LBI é uma ferramenta biomédica utilizada como tratamento coadjuvante nas doenças neurodegenerativas, tal como a DA. Diante disso, é importante o desenvolvimento de estudos de base para compreender de que modo a energia depositada atua nas células neurais; quais são os limites mínimos e máximos de energia a serem depositada na célula neural de maneira a haver uma otimização dos processos celulares.

4 OBJETIVO

Este trabalho objetiva avaliar a viabilidade das células SH-SY5Y diante da TLBI e os possíveis efeitos citotóxicos proporcionados pela energia depositada.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos consistem em avaliar, dentro dos parâmetros propostos, se a energia depositada por meio da TLBI na cultura de células SH-SY5Y (neuroblastoma) pode biomodular o metabolismo celular de modo tal que:

- a) Altere a viabilidade celular frente à exposição da irradiação laser aplicada,
- b) Observe ocorrência de algum efeito citotóxico nas células frente à TLBI nas diferentes densidades de energia depositadas,
- c) Determine qual a dose de energia depositada que melhor interage com a SH-SY5Y positivamente,
- d) Observe se há a promoção dos mecanismos protetivos das células SH-SY5Y frente à exposição destas ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como modelo de estresse oxidativo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

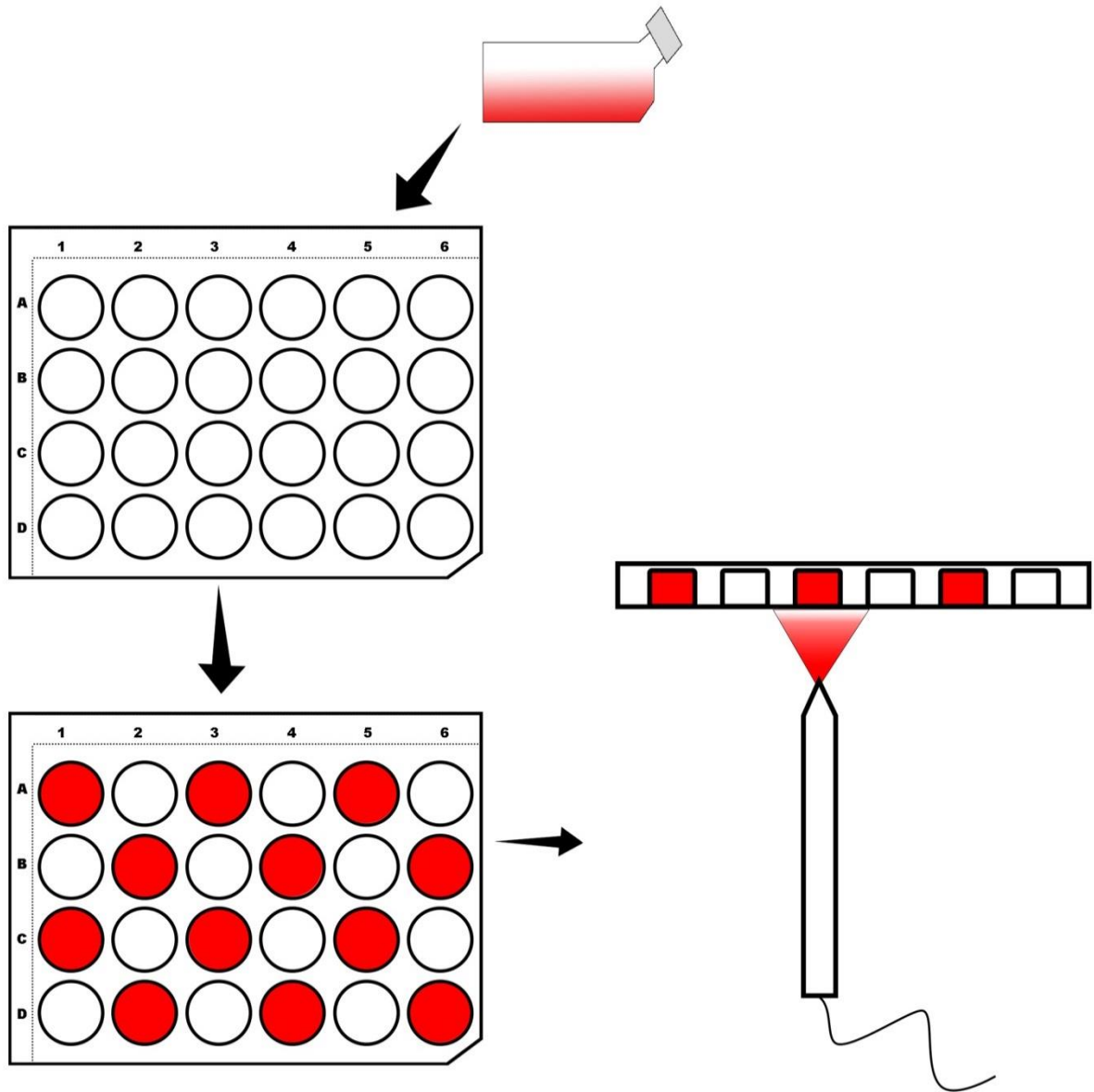
5.1 CULTURA CELULAR

O modelo celular definido para este experimento foi embasado no estudo de Agholme *et al.* (2010), que descreve a célula SH-SY5Y como modelo *in vitro* para estudos de doenças degenerativas do sistema nervoso central (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; XICOY, WIERINGA, MARTENS, 2017; LIANG; LIU; XING, 2012). Trata-se de neuroblastoma humano, SH-SY5Y – ATCC – *American Type Culture Collection*. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium* – Sigma – Aldrich Co. LLC.) alta glicose (89 %) com soro fetal bovino (10 %) e antibiótico (1%) em estufa (*CO2 Incubator – COM-170AICUV – Panasonic Healthcare*) a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂.

As células foram desprendidas da garrafa de cultivo por tripsinização (2 ml de solução de tripsinização, sendo tripsina na concentração de 0,25% + EDTA - etilenodiamina tetra- ácido acético a 0,05%), foram adicionados 3 ml de meio de cultura e a suspensão de células foi coletada, acondicionada em tubo *corning* de 15 ml e seguiu para centrifugação a 1.000 RPM por 5 minutos. O *pellet* de células da centrifugação foi ressuspenso em 2 ml de meio de cultura, foram retirados 10µl deste sobrenadante para a quantificação do número de células em câmara de Neubauer e, assim, definir o número de células a ser adicionado por poço da placa de cultura experimental. As células foram distribuídas em placas de 24 poços, com área de cultivo celular de 1,93 cm² conforme protocolo de Zabeu *et al.* (2021). Cada poço foi preenchido com a quantidade mínima de 1x10⁵ células. (Figura 2).

Foram definidos sete grupos experimentais, sendo: G1 grupo controle; G2, G3, G4, G5, G6 grupos que receberam irradiação; G7 grupo positivo para morte (concentração de 2,5 mM de H₂O₂) e G8 grupo estresse oxidativo (concentração de 0,2 mM de H₂O₂) (Tabela 1).

Figura 2 - Plaqueamento intervalado, a fim de evitar a interferência da irradiação depositada entre os poços cultivados com células; e modo de irradiação de cada poço.



Fonte: do autor

Tabela 1 – Grupos experimentais e energias depositadas

GRUPOS	ENERGIA (J)	TEMPO (s)	DE (J/cm ²)
G1	Controle	-	-
G2	1	5	9,3
G3	5	25	46,51
G4	10	50	93,02
G5	15	75	139,53
G6	20	100	186,04
G7 – morte (concentração de 2,5 mM de H ₂ O ₂)	-	-	-
G8 - estresse oxidativo (concentração de 0,2 mM de H ₂ O ₂)	-	-	-

DE = Densidade de energia

Fonte: do autor

4.2 LBI

O equipamento utilizado para este estudo foi um Laser de diodo Arseniato de Gálio e Alumínio (Bioset[®]), com comprimento de onda (λ) 830 nm, potência de 200 mW, operando em modo de emissão contínua (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros do LBI

PARÂMETROS	LASER
λ (nm)	830
A (cm ²)	0,1075
P (W)	0,2

λ (nm) = comprimento de onda; A (cm²) = área do feixe; P (W) = potência nominal do equipamento

Fonte: do autor

Para aferição da potência nominal do equipamento, foi utilizado o equipamento *Laser Check* (MMO[®]) (Figura 3). No início de cada setup de irradiação da placa de cultura foi feita a aferição confirmando, desta maneira, se a potência nominal emitida, no modo contínuo, estava de acordo com as especificações técnicas do fabricante, e se mantinham ao longo da execução do experimento.

A irradiação das células ocorreu 24 horas após seu plaqueamento, em ambiente escuro a fim de evitar a interferência de outras fontes luminosas. A caneta laser do equipamento foi mantida fixa e em contato com a placa (Figura 4), na porção inferior, contendo as células.

Figura 3 - Equipamento Laser Check (MMO[®]), utilizado para verificação da potência nominal do equipamento de laserterapia.



Fonte: do autor

Figura 4 - Aparato de fixação da probe do equipamento de laserterapia em contato com a placa para ser irradiada.



Fonte: do autor

Ao final da irradiação, cada placa foi coberta com papel alumínio e novamente levada para estufa a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 e 48 horas.

5.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA

Este ensaio avalia a densidade celular, sendo refletida pela determinação da colorimetria das células coradas com cristal violeta (CV). Após 24 e 48 horas da irradiação, o meio de cultura de cada poço foi desprezado, adicionou-se 300 µl, em cada poço de cultivo, de solução de coloração (CV 5%, NaCl 1,7%, paraformaldeído 3,3%, etanol 33,3% e 56,7% água) por 5 minutos à temperatura ambiente. As células, então, foram lavadas e na sequência, em cada poço, foram adicionados 300 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) e incubadas por um período de 1 hora à temperatura ambiente (SOARES *et al.*, 2019). A leitura da absorbância de cada amostra foi determinada em um leitor ELISA *Spectracount* (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, EUA), com filtro de 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

5.4 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT

O teste de MTT é uma avaliação colorimétrica com o objetivo de avaliar a viabilidade celular (CARRARD *et al.*, 2007), que consiste na degradação do sal de MTT, uma solução amarela ([3-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazóliobrometo]) em cristais de formazan, uma solução roxa, pelas desidrogenases mitocondriais das células íntegras e viáveis. Assim, a produção de formazan vai refletir o estado funcional da cadeia respiratória IV. Após 24 e 48 horas da irradiação as células têm o meio de cultura retirado e adiciona-se 300 µl de solução de MTT, na concentração de 0,5 mg/ml, por poço de cultura, que permanece incubando por 3 horas. Ao final deste período de incubação, retira-se a solução de MTT de cada poço e foram adicionados 400 µl de DMSO e mantidos sob agitação por 5 minutos sob agitação, seguido de leitura (GRANATO *et al.*, 2018). Esta leitura da absorbância de cada amostra, foi determinada em um leitor ELISA *Spectracount* (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, EUA), com filtro de 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

5.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR TESTE DE AZUL DE TRIPANO

O ensaio de exclusão por Azul de Tripano avalia a citotoxicidade mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. O princípio do ensaio se baseia no fato de que membranas plasmáticas intactas – presentes em células vivas – impedem a

internalização do corante. Este método colorimétrico cora as células inviáveis que tiveram sua membrana lesionada pela ação de qualquer agente que cause distúrbios à homeostase celular de forma tal que o azul de tripano se incorporará ao interior da célula. Após 24 e 48 horas da irradiação as células têm o meio de cultura retirado cuidadosamente e adicionado 150 µl de azul de tripano a 0,2% por 5 minutos. Em seguida, lavou-se cada poço com solução salina balanceada de *Hank*, e por fim adicionou-se mais 150 µl desta solução salina para a realização da contagem no microscópio óptico Leica DMIL. As imagens das células foram capturadas via câmera de vídeo digital Leica DFC 300FX. (SALLES *et al.*, 2017) e as células foram contadas por meio do *software* ImageJ®.

5.6 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO TESTE DE MITOTRACKER

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial permite avaliar a ocorrência de mudanças no metabolismo celular quando há alguma perturbação. O ensaio utiliza sondas de fluorescência que se difundem passivamente através da membrana plasmática da célula, e este fluoróforo se acumula em mitocôndrias ativas permitindo, assim, qualitativamente, avaliar a integridade e atividade mitocondrial. Para este ensaio utilizamos a sonda *MitoTracker Orange CMXRos* (Molecular Probes, M7512).

As células foram plaqueadas de acordo com o descrito no item 5, sob lamínulas acondicionadas no fundo de cada poço de cultivo. Após 24 e 48 horas da irradiação as células têm o meio de cultura retirado cuidadosamente e adicionado 200 µl de solução de marcação Mitotracker Orange na concentração de 50 nM e seguem para incubação por 20 minutos em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Em sequência, lavou-se cada poço com solução salina balanceada de *Hank*, foram adicionados 200 µl da solução fixadora a base de paraformaldeído, na concentração de 3,7 % (Sigma-Aldrich), deixado em incubação à temperatura ambiente por 10 minutos (XUN *et al.*, 2012; DE PAULA RODRIGUES *et al.*, 2014).

Após este período, foram feitas lavagens sucessiva com solução *Hank*; as lamínulas dos poços cultivados foram retiradas cuidadosamente, identificadas, fixadas sobre uma lâmina de vidro, sob uma gota de corante DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; 4',6'-diamidine-2-phenyl indole; 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride) (*Sigma-Aldrich*) para marcação do núcleo celular. As imagens foram adquiridas em

microscópio invertido confocal de fluorescência por varredura a laser *LSM 700 Carl Zeiss*.
(Zeiss).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados estatisticamente por testes não paramétricos, ANOVA Two-way e confirmados pelo teste de Tukey, uma vez que os resultados obtidos nas análises são qualitativos nominais; não apresentam uma distribuição Gaussiana; considerando-se 0.05% de significância estatística.

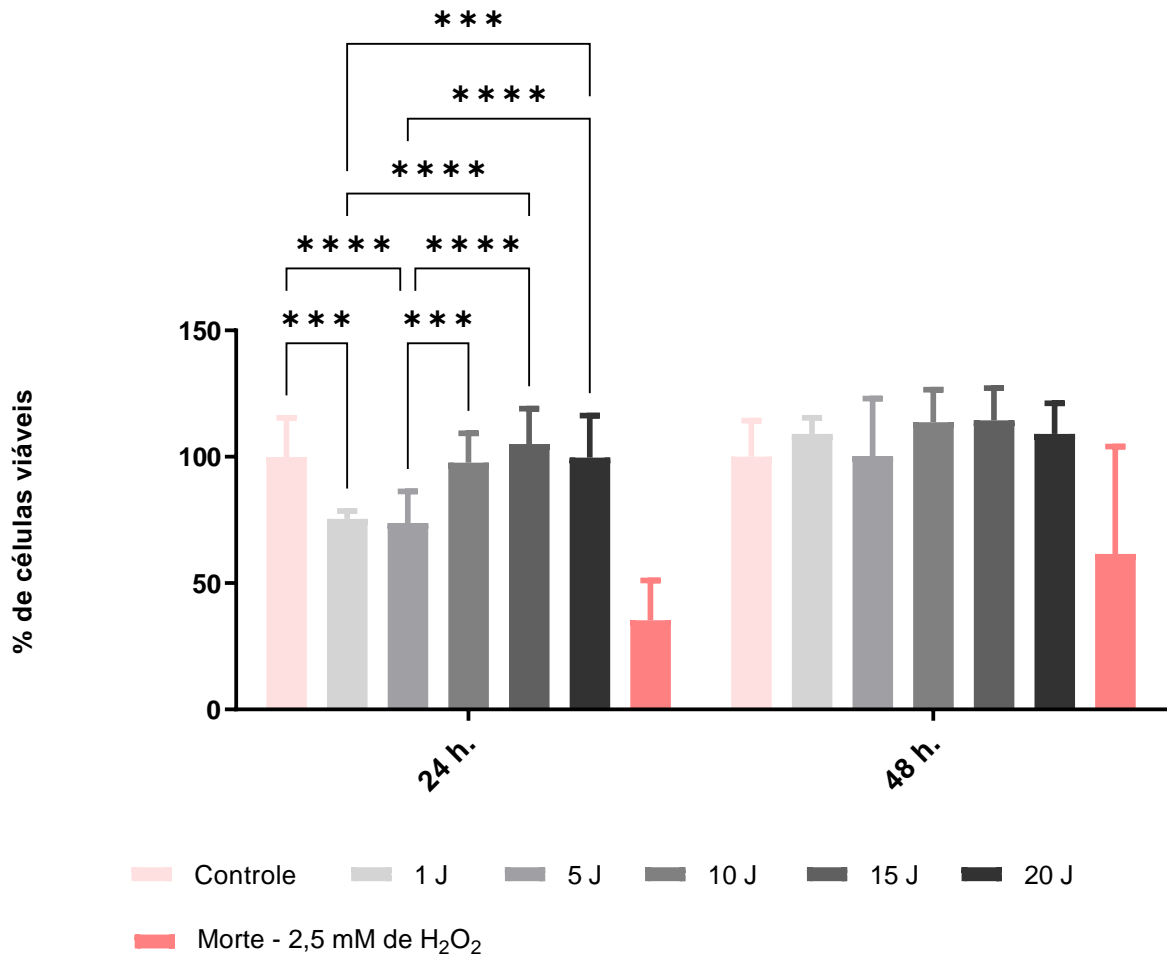
Para a realização das análises estatísticas e gráficas foi utilizado o *software* GraphPad Prism 9® (GraphPad Inc., La Jolla, CA). Todos os experimentos foram realizados com um número amostral de 6, sendo repetido 3 vezes separadamente. Deste modo, confirmando os resultados e aumentando a confiança dos experimentos realizados.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA

Nesta avaliação, a cultura celular foi exposta à irradiação laser, sem nenhum tratamento, com o objetivo de demonstrar a interação da SH-SY5Y com a luz no comprimento de onda de 830 nm, dentro dos parâmetros pré-estabelecidos para este estudo e, assim, avaliar a viabilidade celular. O ensaio foi realizado 24 e 48 horas após a irradiação laser (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular através do teste de CV frente a TLBI



Fonte: do autor

Neste experimento, a avaliação após 24 horas da irradiação das células, a estatística mostrou significância na comparação entre o grupo controle e grupo 1 J, onde $p = 0,0002$, e quando comparado com o grupo 5J, onde $p < 0,0001$; não foram resultados significativos

quando comparado o grupo controle com os grupos 10, 15 e 20 J. Na comparação do grupo 1 J com os grupos 10, 15 e 20 J os resultados foram significativos, no qual $p \leq 0,0001$. Houve diferença significativa na comparação entre o grupo 5 J e o grupo 10 J, na qual $p = 0,0001$, e quando comparado aos grupos tratados com 15 e 20 J, observando-se $p < 0,0001$. Todos os grupos tratados e o grupo controle foram significativos estatisticamente quando comparados ao grupo morte, onde $p < 0,0001$.

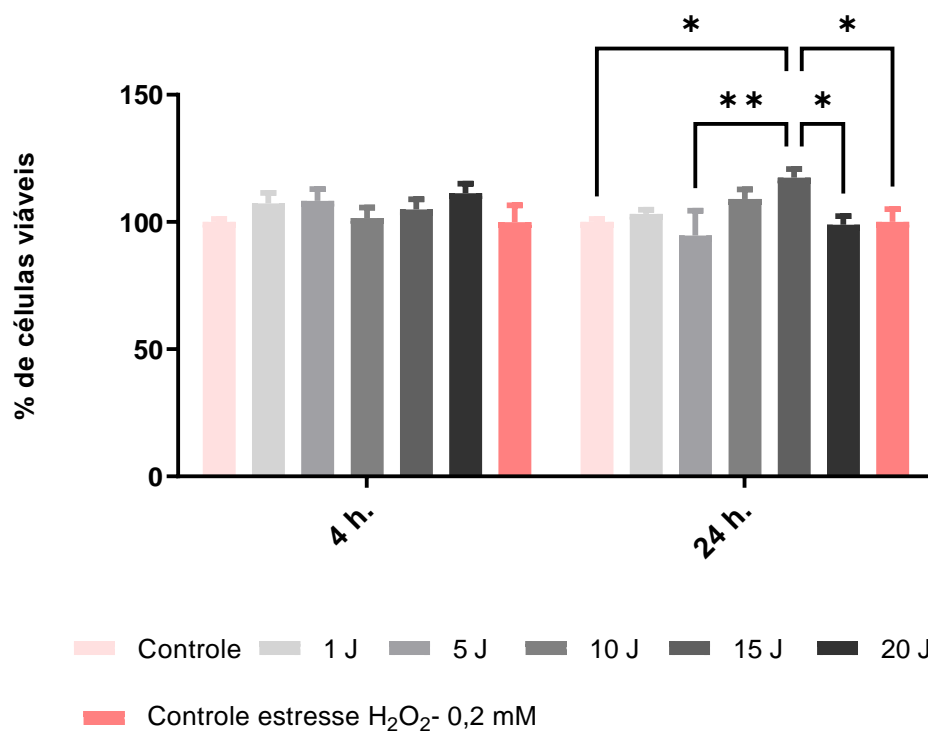
Na avaliação após 48 horas da irradiação das células, na análise estatística não se verificou diferença significativa entre os grupos tratados com as doses 1, 5, 10, 15 e 20 J; e observando-se diferença estatística quando comparado o grupo controle, os grupos tratados com o grupo morte positivo, onde $p < 0,0001$.

A viabilidade das células SH-SY5Y, observada no ensaio de cristal violeta, foi melhor quando irradiadas com as energias de 10, 15 e 20 Joules, nos dois períodos de tempos de avaliação; às doses mais baixas de 1 e 5 Joules não foram efetivas para aumentar a viabilidade celular.

7.2 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS PREVIAMENTE COM LASER SEGUIDO DE INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA

Nesta avaliação a cultura celular foi previamente tratada com laser nos parâmetros pré-estabelecidos e 24 horas depois foi exposta ao H_2O_2 na concentração de 0,2 mM por um período de 4 horas, a fim de promover estresse oxidativo. Foi feita a avaliação da viabilidade celular em 4 e 24 horas após o estresse oxidativo (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular pelo teste CV, pré-tratamento com TLBI seguido de indução do estresse oxidativo na cultura de células.



Fonte: do autor

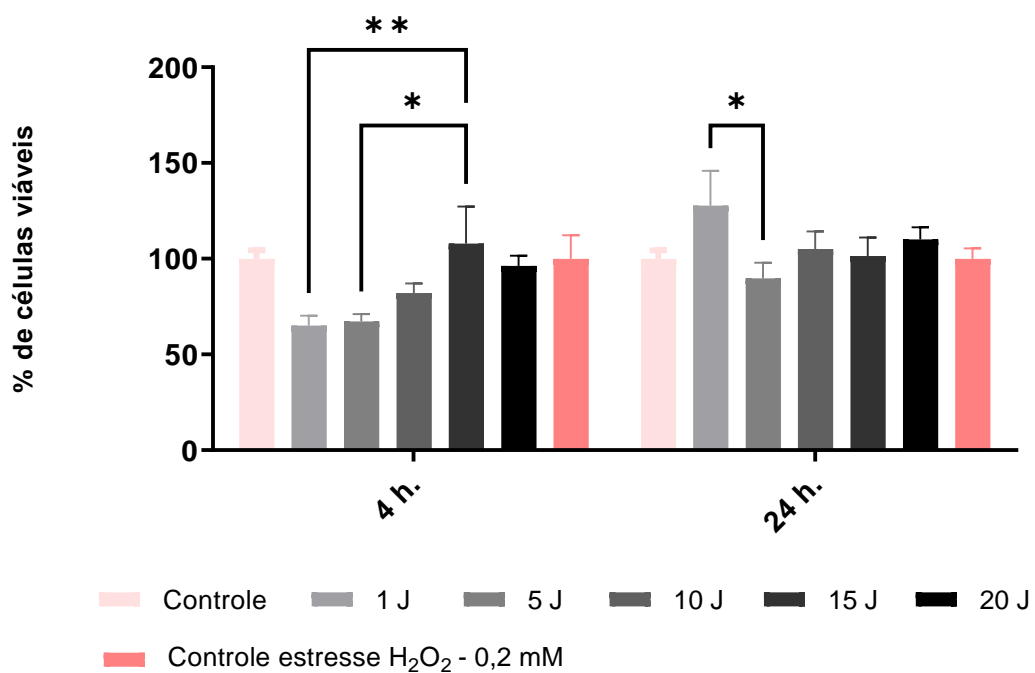
Neste experimento, a avaliação após 4 horas da exposição ao H₂O₂ das células previamente tratadas com TLBI não demonstrou qualquer diferença significativa à análise estatística entre os grupos controle, controle H₂O₂ e irradiados. Já na avaliação 24 horas após a exposição ao H₂O₂, a análise estatística mostrou diferença significativa na comparação entre os grupos controle sem qualquer tratamento e o grupo irradiado com 15 J de energia; grupo controle H₂O₂ e o grupo irradiado com 15 J; entre os grupos irradiados com 5 e 15 J e entre os grupos 15 e 20 J, onde $p = 0,0069$.

Desse modo, estes resultados demonstram que houve efeito fotoprotetor em todas as doses de energias depositadas na cultura de células SH-SY5Y sem que estas tenham sofrido ação danosa causada pelo estresse oxidativo.

7.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR, AS CÉLULAS FORAM PREVIAMENTE INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRATADAS COM LASER NA SEQUÊNCIA, PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA

Neste ensaio, a cultura celular foi exposta previamente ao H₂O₂ na concentração de 0,2 mM por um período de 4 horas, a fim de promover um estresse oxidativo e, na sequência, sucedeu-se a irradiação com laser nas energias e parâmetros pré-estabelecidos e, assim, permitindo avaliar a viabilidade celular. Foi feita a avaliação da viabilidade celular em 04 e 24 horas após o estresse oxidativo (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular pelo teste CV, indução do estresse oxidativo na cultura de células seguido pelo tratamento com TLBI.



Fonte: do autor

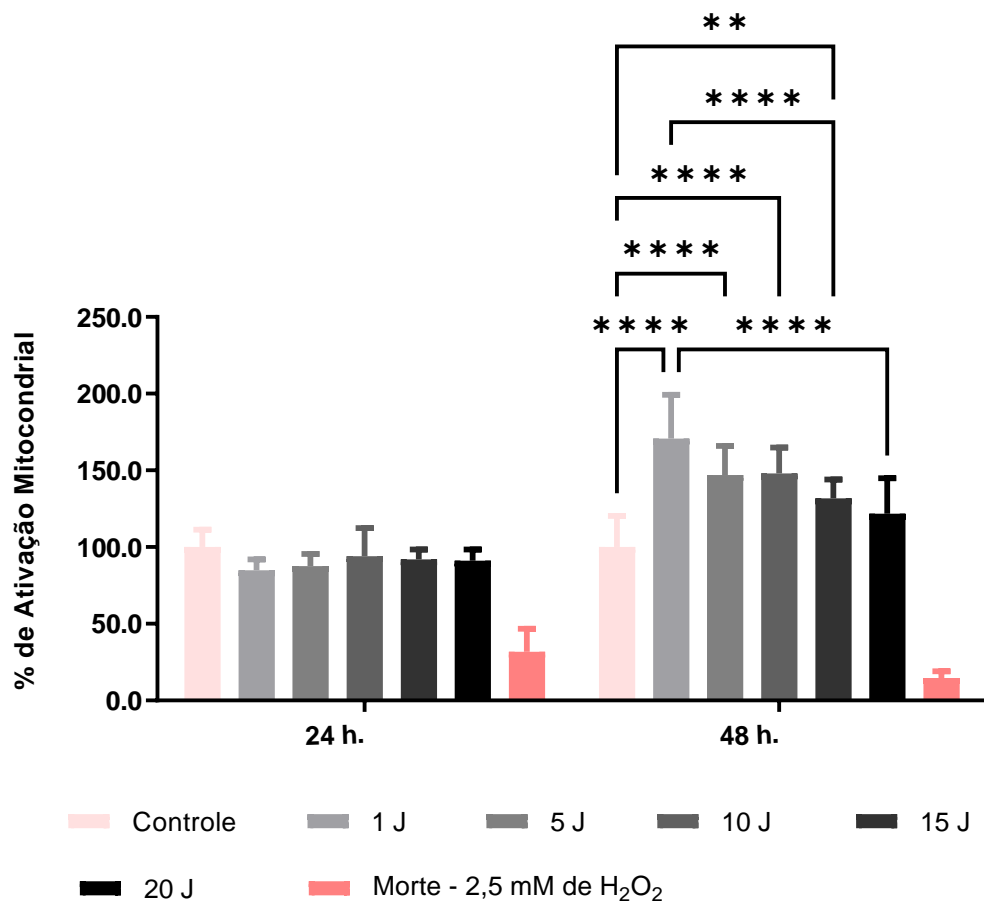
Os resultados deste experimento mostram que na avaliação de 4 horas houve diferença entre os grupos 1 J e 15 J e entre os grupos 5 J e 15 J, onde $p \leq 0,0023$. Na avaliação de 24 horas, a diferença estatística ocorreu somente na comparação entre os grupos 1J e 5 J, com $p \leq 0,0023$. Tanto na avaliação de 4 horas como na de 24 horas não houve diferença significativa na comparação entre os demais grupos testados.

A célula SH-SY5Y sofreu o estresse oxidativo, permitindo inferir que houve ativação dos mecanismos de recuperação celular e não houve proliferação.

7.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE MTT

Nesta avaliação, a cultura celular foi exposta à irradiação laser, sem qualquer desafio, com o objetivo de demonstrar a interação da SH-SY5Y ao comprimento de onda de 830 nm dentro dos parâmetros pré-estabelecidos e assim avaliar a atividade mitocondrial. Avaliação feita em 24 e 48 horas após a irradiação laser (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo MTT frente a TLBI



Fonte: do autor

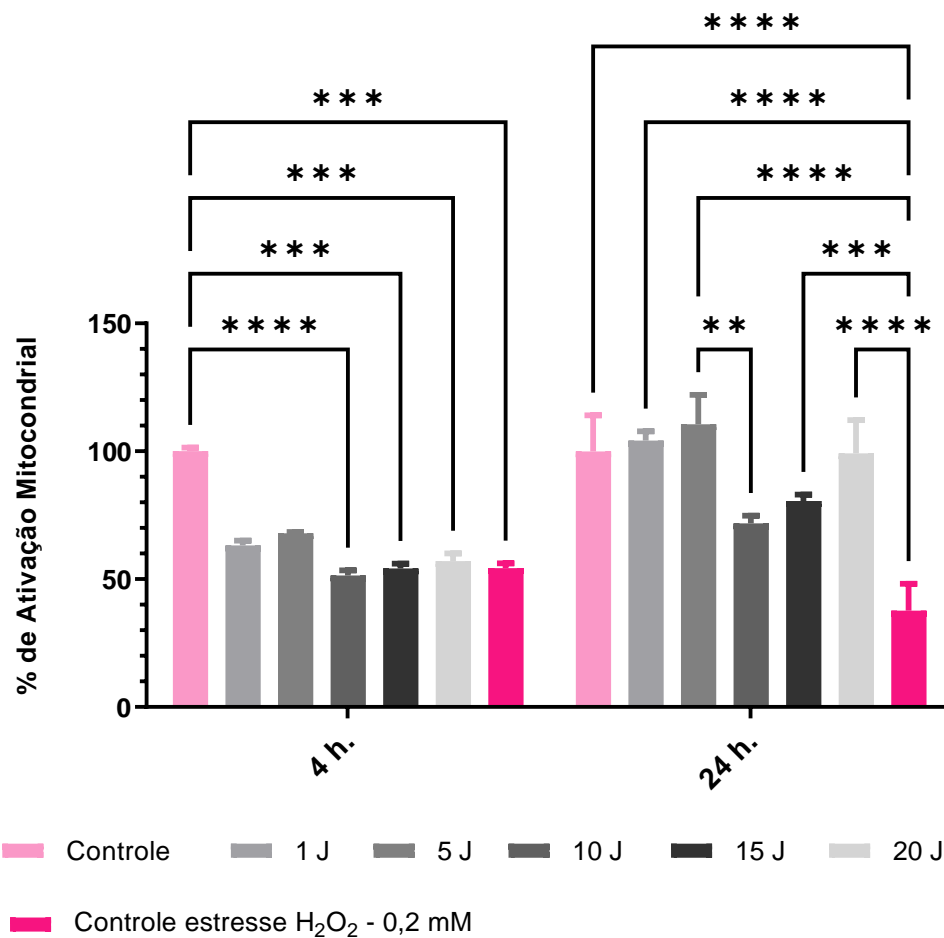
O resultado estatístico da avaliação da atividade mitocondrial pelo teste MTT, mostra que na avaliação de 24 horas após a exposição da cultura celular ao LBI não houve qualquer diferença na comparação entre o grupo controle e os grupos tratados. Na avaliação de 48 horas após a irradiação, os resultados estatísticos mostram diferença significativa na comparação entre os grupos 1J e 5J; 1J e 10 J; 5 J e 20 J, onde $p = 0,0015$. Entre os grupos 1J e 15 J; 1J e 20 J houve diferença significativa em que $p < 0,0001$. Houve diferença entre todos os grupos quando comparados com o grupo morte, onde $p < 0,0001$, tanto na avaliação de 24 como de 48 horas.

Não ocorreu aumento de atividade mitocondrial em 24 horas em nenhuma das doses laser irradiadas. Após 48 horas da irradiação, ocorreu aumento de atividade mitocondrial nas doses mais baixas da irradiação laser.

7.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM CULTURA DE CÉLULAS SH-SY5Y TRATADAS PREVIAMENTE COM LASER E INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO, PELO TESTE MTT

Nesta avaliação a cultura celular foi previamente tratada com laser nos parâmetros pré-estabelecidos e 24 horas depois foi exposta ao H₂O₂ na concentração de 0,2 mM por um período de 04 horas, a fim de promover um estresse oxidativo. Foi feita a avaliação da viabilidade celular em 04 e 24 horas após o estresse oxidativo (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste MTT, pré-tratamento com TLBI seguido de indução do estresse oxidativo na cultura de células.



Fonte: do autor

Neste experimento, os resultados mostram que na avaliação de 4 horas, quando comparado o grupo controle estresse H_2O_2 – 0,2 mM com os grupos tratados com LBI previamente, não houve diferença significativa, sendo somente estatisticamente diferente quando comparado com o grupo controle, onde $p < 0,001$. Na comparação entre o grupo controle e os grupos tratados com laser 1J e 5 J, seguido de exposição ao H_2O_2 – 0,2 mM, houve diferença estatística ($p = 0,004$). Na mesma comparação entre o grupo controle com os grupos irradiados com 10 J, 15 J e 20 J, seguido da exposição ao H_2O_2 – 0,2 mM, a diferença significativa foi de $p < 0,0001$.

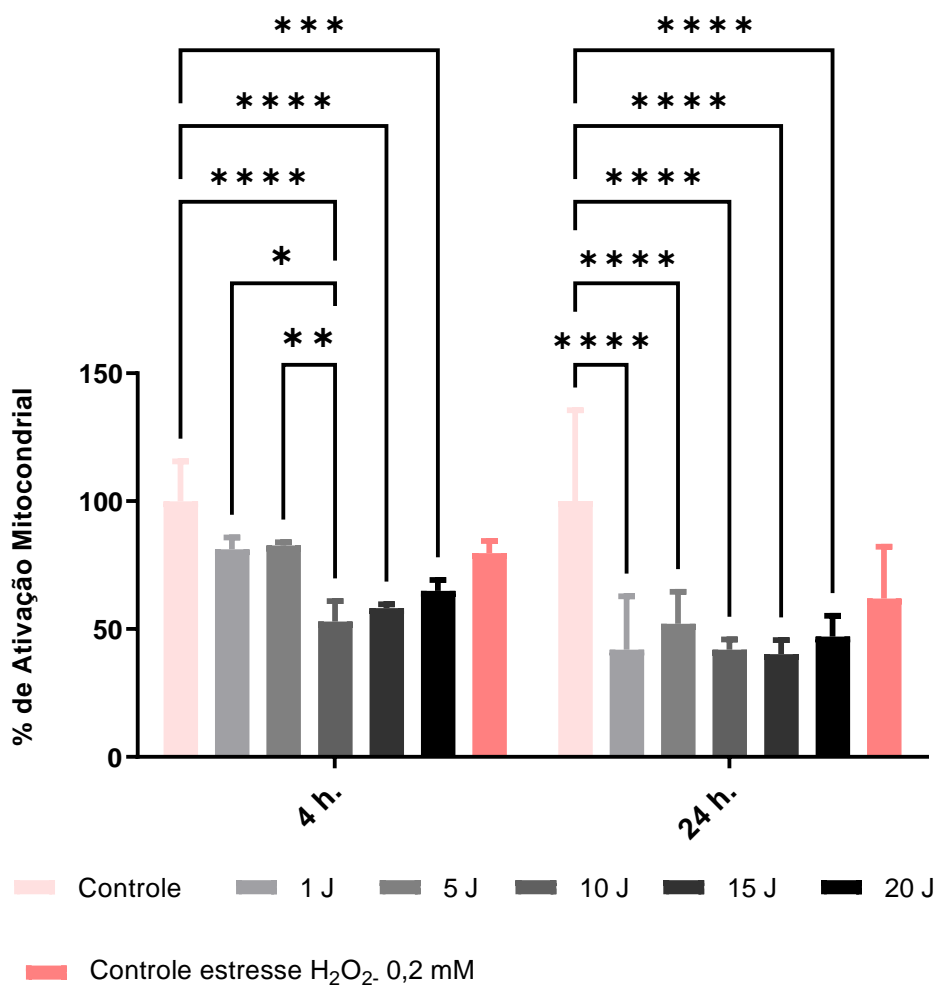
Na avaliação, após 24 horas do tratamento, todos os grupos tratados e o grupo controle, quando comparados ao grupo controle estresse H_2O_2 – 0,2 mM, foram significativamente diferentes, com $p < 0,0001$. Na comparação entre os grupos tratados previamente com laser seguidos da exposição ao peróxido de hidrogênio a estatística mostrou diferença significativa entre os grupos 1 J e 10 J, onde $p = 0,004$. Entre os grupos 5 J e 10 J; 5 J e 15 J a diferença significativa teve $p \leq 0,004$. Na comparação entre o grupo controle e os grupos tratados não houve diferença significativa.

Pode-se inferir que na avaliação de 4 horas o laser protegeu as células frente à exposição ao H_2O_2 , mas não aumentou a atividade mitocondrial e na avaliação após 24 horas da exposição ao H_2O_2 as doses menores da irradiação laser aumentou atividade mitocondrial.

7.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL PELO TESTE MTT, AS CÉLULAS FORAM PREVIAMENTE INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO E TRATADAS COM LASER NA SEQUÊNCIA

Nesta avaliação, a cultura celular foi exposta previamente ao H_2O_2 na concentração de 0,2 mM por um período de 04 horas, a fim de promover um estresse oxidativo e, na sequência, sucedeu-se a irradiação com laser nas energias e parâmetros pré-estabelecidos e, assim, foi avaliada a atividade mitocondrial das células. Foi feita a avaliação mitocondrial em 04 e 24 horas após a indução do estresse oxidativo seguido do tratamento da amostra com TLBI (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste MTT, indução do estresse oxidativo na cultura de células seguido pela TLBI.



Fonte: do autor

Na avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT, a estatística demonstrou que na avaliação após 4 horas de exposição da cultura de células ao peróxido de hidrogênio seguido de tratamento com laser, a comparação entre os grupos tratados com 10 J, 15 J e 20 J e o grupo controle foi significativa, onde $p < 0,0001$. Na comparação entre o grupo controle estresse H₂O₂ – 0,2 mM e o grupo controle não houve diferença significativa, onde $p = 0,0765$; e quando comparado ao grupo 10 J observou-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0118$). O grupo controle estresse H₂O₂ – 0,2 mM não teve diferença significativa quando comparado aos grupos tratados com laser na avaliação de 4 horas. Na comparação entre os grupos irradiados a diferença significativa ocorreu entre os grupos 1 J e 10 J, onde $p = 0,0118$; entre os grupos 5 J e 10 J, onde $p \leq 0,0118$.

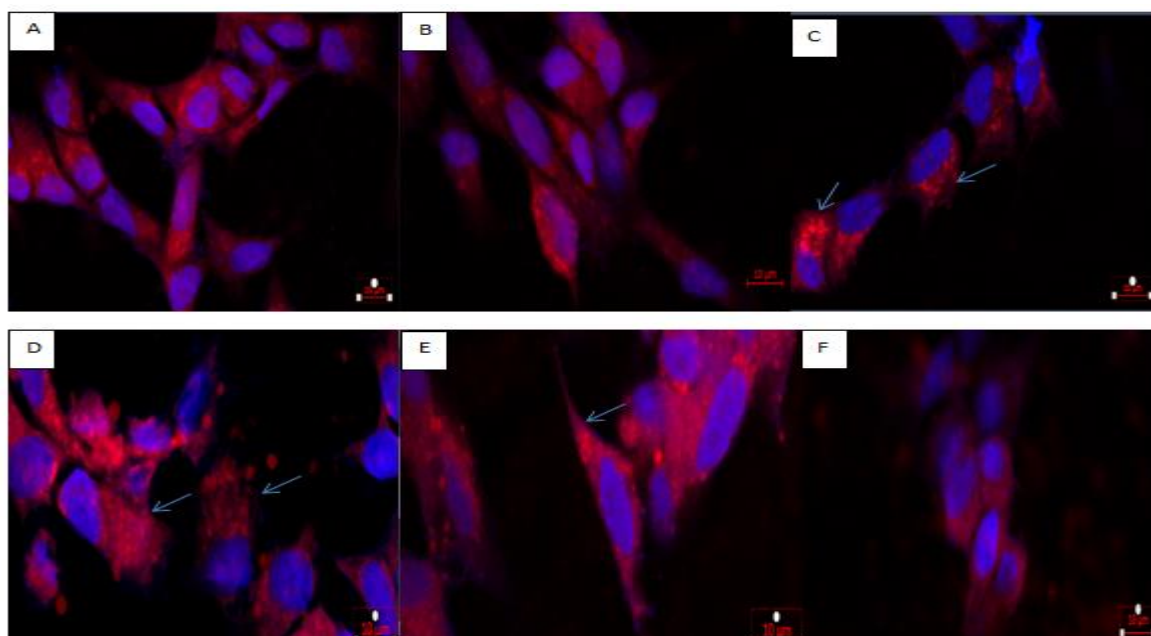
Os resultados estatísticos mostram que após 24 horas da exposição da cultura de células ao peróxido de hidrogênio na concentração de 0,2 mM, seguido do tratamento com laser, a significância ficou na comparação entre o grupo controle com todos os grupos irradiados (1, 5, 10, 15 e 20 J), onde $p < 0,0001$. Não houve diferença na comparação entre os grupos tratados com laser e em na comparação com o grupo controle estresse H_2O_2 , onde $p = 0,0765$.

Não houve aumento da atividade mitocondrial frente à exposição das células ao peróxido nas primeiras 04 horas de contato quando as células foram tratadas com 1, 5 e 10 Joules. Em 24 horas as células não sofreram mais estresse oxidativo por ação do H_2O_2 .

7.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE MITOTRACKER

Neste ensaio a microscopia de fluorescência foi utilizada para medir potencial de membrana mitocondrial e morfologia no núcleo após 24 e 48 horas das células serem irradiadas. As imagens mostram que há ativação mitocondrial nas dosagens de 1, 5, 10 e 15 J na avaliação após 48 horas da TLBI, corroborando com os achados no teste de avaliação mitocondrial pelo teste de MTT (Figura 11, item b, c, d, e). Não houve eventos morfológicos significativos no núcleo celular (Figura 11).

Figura 11 – Imagem de microscopia de fluorescência (confocal) a) controle; b) 1 J; c) 5 J; d) 10 J; e) 15 J; f) 20 J. As setas indicam as mitocôndrias filamentosas pelo aumento da atividade mitocondrial.



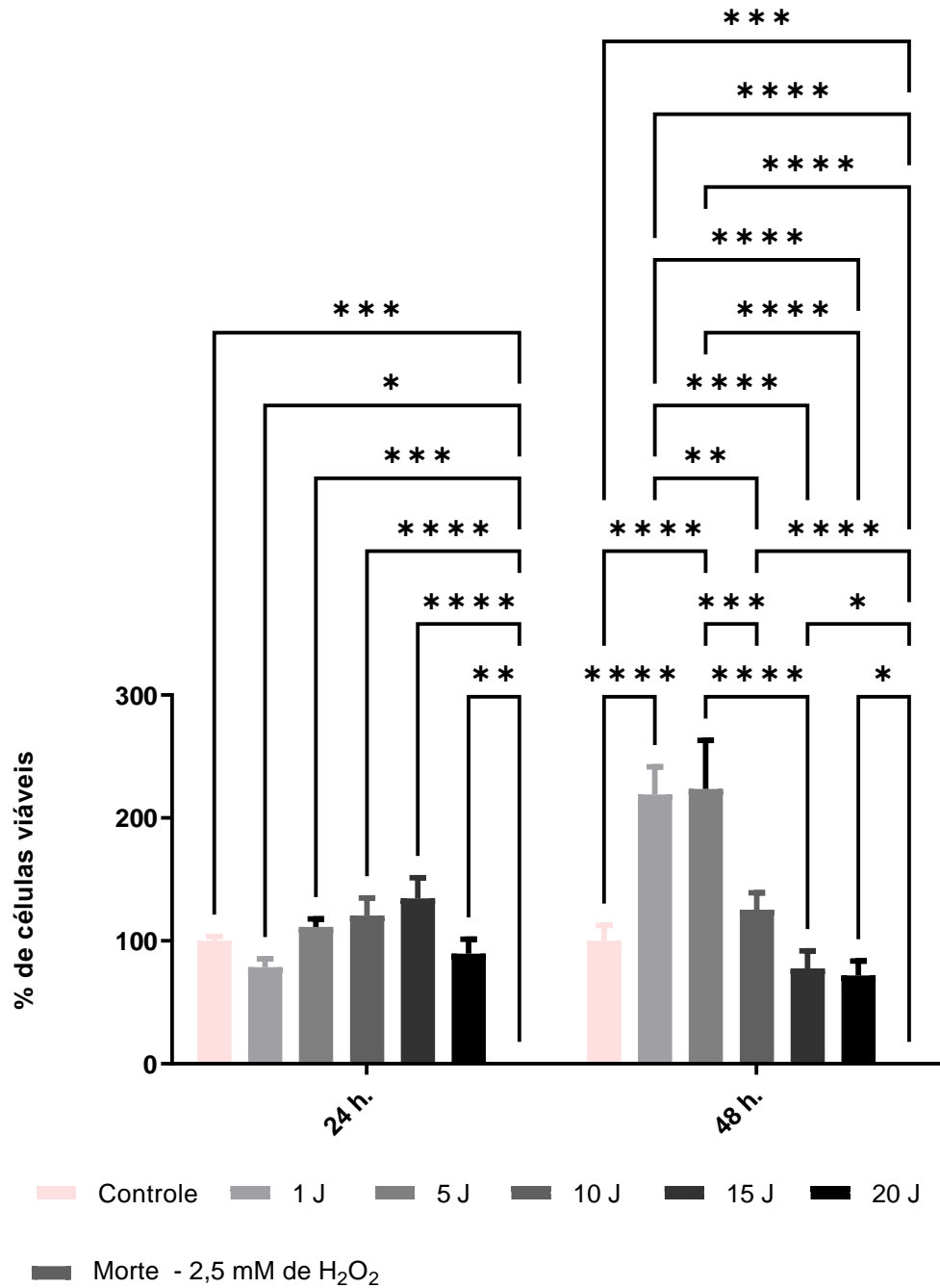
Fonte: do autor

Imagens de microscopia de fluorescência, marcação por Mitotracker Orange: A) imagem das células grupo controle sem LBI e sem peróxido, as mitocôndrias não estão ativadas e encontram-se em formato globular; B) imagem das células do grupo 1 J; C) imagem das células do grupo 5 J, com atividade mitocondrial ativada; D) imagem das células do grupo 10 J, com aumento da atividade mitocondrial a organela se mostra mais espalhada; E) imagem das células do grupo 15 J, mitocôndria ainda ativa; F) imagem das células do grupo 20 J, nesta energia, as células já não demonstram aumento significativo da atividade mitocondrial.

7.8 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR, CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS APENAS COM LASER, PELO TESTE DE AZUL DE TRIPANO

Nesta avaliação, a cultura celular foi exposta à irradiação laser, sem qualquer desafio, com o objetivo de demonstrar a interação da SH-SY5Y ao comprimento de onda de 830 nm dentro dos parâmetros pré-estabelecidos e, assim, avaliar a ocorrência de efeitos citotóxicos. Avaliação feita em 24 e 48 horas após a irradiação laser (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade da TLBI em células SH-SY5Y pelo teste Azul de Tripano



Fonte: do autor

Neste ensaio de citotoxicidade, na avaliação de 24 horas, a estatística foi significativa quando comparados os grupos controle, grupos tratados com TLBI (1, 5, 10, 15 e 20 J) com o grupo morte positivo, onde $p < 0,0001$. Na comparação entre os grupos tratados com laser e o controle não houve nenhuma diferença significativa, onde $p = 0,4157$.

Na avaliação de 48 horas após a TLBI os resultados estatísticos foram significativos na comparação entre o grupo morte e os outros grupos tratados e controle, onde $p < 0,0001$. Na comparação entre o grupo controle e os grupos tratados com 1 J e 5J a diferença significativa teve $p < 0,0001$. Na comparação entre os grupos tratados obtivemos estatística significativa entre grupo 1 J e 10 J, onde $p = 0,0038$; entre grupos 1J e 15 J; 1J e 20 J, onde $p < 0,0001$; entre 5 J e 10 J, onde $p \leq 0,0001$; entre grupos 5 J e 15 J; 5 J e 20 J, onde $p < 0,0001$. Na comparação entre os grupos tratados 10, 15 e 20 J não houve diferença estatística entre eles, onde $p = 0,4157$.

A interação do TLBI não promoveu efeitos citotóxicos à célula SH-SY5Y.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, buscou-se elucidar se os processos celulares sofrem alguma alteração quando há interação da energia fornecida pela luz laser com o modelo de células neurais SH-SY5Y. A hipótese experimental foi se a TLBI promoveria biomodulação do modelo celular de modo a manter a viabilidade e proliferação celular, não acarretaria efeito citotóxico resultante desta interação e, por fim, se o laser melhora e/ou propicia os mecanismos de defesa da célula quando esta é submetida ao estresse oxidativo pela exposição ao H₂O₂. Os resultados obtidos na presente experimentação demonstraram que houve biomodulação da célula SH-SY5Y frente à irradiação laser dentro dos parâmetros pré-estabelecidos previamente, para algumas das energias depositadas neste ensaio de maneira imediata e, também, á longo prazo.

A terapia á laser de baixa intensidade (TLBI), nos comprimentos de onda dentro do espectro eletromagnético visível e infravermelho próximo compreendido entre as bandas de 650 até 1060 nm, é uma ferramenta biomédica em áreas da medicina humana e animal (ESTEVÃO, 2009; ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2011; DONG et al., 2015; DA COSTA FURTADO; ZABEU; DA SILVA, 2021; GHAEMI et al., 2019), alavancada pelo avanço das pesquisas científicas nas ciências básicas para conhecimento de fotobiologia e bioenergética.

A resposta celular frente à interação com laser é determinada pela absorção da energia por moléculas fotoceptoras – os cromóforos presentes nas mitocôndrias, sendo a Citocromo C Oxidase, presente no complexo IV da cadeia mitocondrial, o principal deles. Durante a irradiação, que converte os fótons em sinais que estimulam os processos celulares, modulando vias de sinalização, produção de espécies reativas de oxigênio, ATP, Ca²⁺, NO e outros eventos metabólicos das células (SOMMER, 2019). Efeitos secundários, tais como sinalização de estresse oxidativo, proliferação e diferenciação e a homeostase celular são estimulados pela interação do laser com as células (EVANS; ABRAHAMSE, 2009; TSAI; HAMBLIN, 2017).

Tsai e Hamblin (2017) em seu trabalho de revisão esclarecem que a TLBI não se trata de um processo térmico – o que poderia ser prejudicial às células; são efeitos fotofísicos e fotoquímicos que promovem efeitos em várias escalas biológicas. Diante disso, já é aceita a proposição pelos autores e outros pesquisadores (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015; SOMMER, 2019) desta terapia física, que ela tenha a denominação de PBM – *Photobiomodulation therapy* ou Terapia de Fotobiomodulação.

Dentre os efeitos fotobiomoduladores destacam-se a estimulação neural, neuroproteção e neurogênese. A aquisição de maiores conhecimentos sobre a terapia fotobiomoduladora no tecido nervoso trouxe grande avanço ao tratamento de processos neurodegenerativos (HAMBLIN, 2019).

No presente trabalho, a avaliação da viabilidade da célula SH-SY5Y– neuroblastoma humano, modelo experimental *in vitro* para estudos de doenças neurodegenerativas (AGHOLME *et al.*, 2010) – frente à irradiação laser aplicada nas energias de 1, 5, 10, 15 e 20 J, possibilitou inferir, pelos resultados encontrados no ensaio colorimétrico de cristal violeta, que as células metabolizaram completamente a energia depositada na avaliação 24 horas após a irradiação e que as amostras mantiveram-se inalteradas em relação aos resultados iniciais na avaliação de 48 horas após a TLBI. As células testadas tiveram melhor interação com a densidade de energia (DE) de 139.53 J/cm² e energia (E) de 15 Joules, quando comparadas com os demais grupos experimentais irradiados, sem qualquer desafio (Figura 5).

Esta hipótese mostra-se verdadeira e corrobora com achados Zaizar, Gonzalez-Lima e Telch (2018) que utilizou laser transcranialmente *in vivo* (1064 nm, 3,4W, DE de 120 J/cm²) obtendo melhora significativa dos pacientes com transtornos neurológicos ligados à ansiedade e pânico. Seus resultados mostram, dessa maneira, que a interação da irradiação da luz com as células, sendo ela neural ou não, apresentam resultados significativos quanto a sua viabilidade dentro de parâmetros seguros da terapia com laser de baixa intensidade.

Outros estudos demonstram que as energias mais baixas depositadas no tecido vivo apresentam resultados mais efetivos. Alghamdi, Kumar e Moussa (2012) testaram diferentes culturas celulares quanto à viabilidade celular frente à irradiação laser, dentro dos comprimentos de onda, compreendido no espectro eletromagnético visível e infravermelho próximo. Sugerem que o intervalo de densidades de energia (DE) que são benéficos para diferentes modelos de culturas celulares – fibroblastos, células endoteliais, células esqueléticas, queratinócitos, mioblastos e outros tipos de células – está entre 0,5 e 4 J/cm², dependente do modo de entrega desta energia e de parâmetros como potência do equipamento de entrega destes fótons, área irradiada ou tamanho do *spot* laser, podendo alcançar DE mais elevadas ou menores. Ressaltam que o conhecimento dos parâmetros físicos e uso adequado podem tornar esta terapia fundamental para engenharia e regeneração de tecidos em diferentes áreas da saúde.

A pesquisa desenvolvida por Terena e colaboradores (2020) testou a viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana frente ao laser vermelho e infravermelho (IV)

próximo dentro de parâmetros (ArGaAl; 660 e 780nm; 40 mW; DE de 1,5,10 e 20 J/cm², modo contínuo, área irradiada de 0,04 cm²) similares ao utilizado no presente trabalho e encontrou resultados positivos de estímulo da viabilidade e proliferação celular com a luz vermelha. Já no trabalho de Safian *et al.* (2020) em que foi avaliada a viabilidade celular de células humanas após a irradiação laser no espectro vermelho e IV próximo (630 e 810 nm, 50mW, DE de 0.6, 1.2 e 2.4 J/cm², modo contínuo, área irradiada de 1,91 cm²) obteve-se resultado positivo quanto à viabilidade de sua amostra no comprimento de onda IV.

Em nosso estudo foi utilizado o comprimento de onda no espectro infravermelho de 830 nm e parâmetros seguros de fotobiomodulação, em acordo com estudos de Zabeu *et al.* (2021) que utilizaram cultura de células 9L/lacZ (830 nm, 40 mW, DE de 0,5 á 3 J/cm²) e obteve resultados positivos quanto à viabilidade celular.

A divergência de resultados encontrados na literatura científica apresentada pode estar relacionada à variabilidade dos parâmetros laser, utilizado em cada experimento, e do tipo de célula modelo. De acordo com Huang *et al.* (2011), a revisão feita sobre os efeitos bifásicos do laser no tecido biológico envolve basicamente dois parâmetros muito importantes que são o comprimento de onda e a penetração da luz no tecido, e isso é bastante variável entre cada tipo celular e a complexidade de cada tecido. Assim, a divergência entre os parâmetros observados em diferentes literaturas pode explicar que em um mesmo comprimento de onda, a potência de entrega, as densidades de energia e tamanho de *spot* possa fornecer resultados incomparáveis entre si, e nem por isso são melhores ou piores. Isso nos leva então a inferir que nossos achados quanto à viabilidade da célula SH-SY5Y frente ao laser, na comparação com outros resultados descritos na literatura, são sinalizadores de fotobiomodulação positiva deste modelo.

Quando submetemos o modelo celular SH-SY5Y ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tratamos com TLBI, antes e depois do estresse, temos resultados que podem elucidar melhor a nossa hipótese de que a fotobiomodulação, os fótons entregues às células SH-SY5Y, promove seus mecanismos protetivos e de manutenção da homeostase celular.

O resultado da avaliação pelo teste de cristal violeta da viabilidade da célula SH-SY5Y, tratada previamente com laser e na sequência exposta ao H₂O₂, mostrou que houve efeito fotoprotetor promovido pelo laser em todas as energias aplicadas na avaliação de 24 horas. Os resultados sugerem que a dose de 15 J (DE = 139.53 J/cm²) foi a mais efetiva na ativação dos mecanismos antioxidantes.

Em acordo com nossos resultados há o estudo de De Oliveira *et al.* (2018) que submeteu ratos Wistar a exercícios resistidos de alta intensidade, tratando-os antes e depois do exercício com LBI (830 nm, 144 J/cm², 4 J/ponto, 100 mW) e avaliou o estresse oxidativo do tecido muscular, tendo como resultado que a TLBI reduziu o estresse oxidativo, evitou a redução da ativação e ação dos antioxidantes celulares, bem como aumentou seus níveis circulantes nestes tecidos. Migliario *et al.* (2018) trataram cultura de neutrófilos que foram irradiados (980 nm, 1W, DE de 3.25, 6.5, 16.23, 32.47 e 48,7 J/cm²) e comprovando que mesmo fazendo a inibição dos mecanismos antioxidantes da cultura após a terapia laser as células responderam positivamente quanto a viabilidade, pois a energia depositada estimulou os mecanismos antioxidantes anteriormente suprimidos. Estes resultados também corroboram com os achados do presente experimento.

Quando o modelo celular SH-SY5Y foi submetido ao estresse induzido pelo H₂O₂ e depois recebeu o tratamento com laser os resultados também foram significativos e positivos quanto à biomodulação dos mecanismos antioxidantes celulares. Este resultado pode estar relacionado com a efetiva ação do peróxido de hidrogênio na cultura celular.

O H₂O₂ isoladamente é inócuo e estável quando adicionado diretamente ao meio de cultura simples, contudo na presença de células a concentração de H₂O₂ decai de modo dependente da concentração celular. O H₂O₂ difunde-se com facilidade no citoplasma celular, sendo a catalase a enzima responsável pelo mecanismo de detox, e a efetividade desta enzima inversamente proporcional aos danos citotóxicos (GILLE; JOENJE, 1992). Os efeitos deletérios e citotóxicos provocados nas células pela exposição ao H₂O₂, tal como a peroxidação lipídica e os danos ao DNA, decorrem da formação de radicais OH⁻ catalisados pelos metais presentes nas cromatinas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Outros compostos citotóxicos, tais como o óxido nítrico (NO) e peroxionitrito (ONOO⁻), formados a partir do peróxido de hidrogênio e dos superóxidos levam à oxidação lipídica e danos às proteínas celulares, sendo estes efeitos altamente deletérios para as células neurais que resultando em morte por apoptose e necrose (KLEIN; ACKERMAN, 2003).

Zabeu *et al.* (2022) testaram células SH-SY5Y frente à exposição em diferentes concentrações de H₂O₂ e observaram que a partir da concentração de 0,2 mM, no tempo de 2 horas, há uma diminuição significativa no número de células em relação ao grupo controle, sendo assim, com o aumento das demais concentrações em relação ao tempo, ocorrem mais danos celulares. A diminuição da viabilidade celular quando SH-SY5Y é exposta ao peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à concentração e ao tempo de exposição. Em

concentrações superiores, a partir de 0,5 mM, as células evoluíram para morte em função do tempo de exposição. Seus achados experimentais mostram que na menor concentração e no menor tempo de exposição (0,2 mM em 2 horas) é possível promover o estresse oxidativo no modelo celular de neuroblastoma humano e assim estabelecer como protocolo de avaliação *in vitro* para diferentes tratamentos e estudos dos mecanismos antioxidantes.

Diante deste exposto sobre o peróxido de hidrogênio, nossa hipótese testada foi que a exposição da célula SH-SY5Y ao H₂O₂ no período de 04 horas tenha promovido o estresse oxidativo e o que o tratamento com TLBI biomodulou os mecanismos antioxidantes da célula de modo imediato. Como observado no ensaio de viabilidade pelo teste de cristal violeta, as células tratadas após o estresse, na avaliação de 04 horas pós-exposição ao peróxido, as doses compreendidas entre 5 e 15 J foram biomoduladoras, sendo a dose de 15 J mais efetiva em relação as demais energias depositadas na cultura de células SH-SY5Y. Na avaliação mais tardia, de 24 horas após a exposição às energias de 1 e 5 J foram mais eficientes, destacando-se a dose de 1 J.

Volpato *et al.* (2011) submetem cultura de fibroblastos ao estresse nutricional e trataram com laser vermelho (660 nm, 40 mW, 4 e 8 J), laser IV (780 nm, 50 mW, 5 e 10 J) e com LED (637 nm, 40 mW, 4 e 8J) observando que a fototerapia estimulou a viabilidade de fibroblastos em déficit nutricional. Este estudo corrobora com o presente resultado, uma vez que Volpato *et al.* (2011) observaram maior eficiência nos comprimentos de onda de 780 nm. De Souza da Fonseca *et al.* (2021) em sua revisão de literatura, afirmaram que as células eucariontes e procariontes frente a exposição de radiações emitidas por fontes de baixa potência podem responder positivamente em condições estressantes de sobrevivência, sendo esta uma base da fotobiomodulação clínica, uma vez que nos tecidos lesionados e infectados as células encontram-se em condições de estresse.

No ensaio de MTT realizado no presente experimento, os resultados observados vão de encontro com os achados nos resultados de viabilidade celular. Neste ensaio em que as células SH-SY5Y foram submetidas apenas à TLBI, na avaliação de 24 horas não houve ativação mitocondrial em nenhuma das doses de energias depositadas. Já na avaliação de 48 horas – avaliação mais tardia – os resultados foram estatisticamente significativos, demonstrando a interação das células em todos os grupos de energias depositadas, com destaque para a biomodulação que ocorreu na dose de energia de 1 J. Quanto à ativação mitocondrial. Hamblin (2017), em sua revisão, verificou a fotobiomodulação tem efeito estimulante sobre o metabolismo celular pelo aumento do ATP e eleva a produção de espécies reativas de oxigênio

(ERO) em células normais. Isso explica os resultados encontrados no presente estudo na avaliação de viabilidade e atividade mitocondrial. Entretanto, em células estressadas há diminuição, fotobiomodulação regula os mecanismos antioxidantes e conseqüentemente as manifestações de estresse oxidativo.

No ensaio em que aplicamos TLBI pré e pós a indução ao estresse oxidativo por H₂O₂ no modelo celular SH-SY5Y e avaliamos a atividade mitocondrial pelo teste MTT, nossa hipótese era se o laser promoveria um aumento exagerado desta organela, de tal modo a levar a um efeito inibitório. Nossos resultados demonstraram que, quando ofertamos TLBI antes do estresse oxidativo às células, na avaliação inicial após 04 horas da exposição ao peróxido, observou-se resposta positiva ao efeito fotoprotetor, mas não houve ativação mitocondrial significativa. Já na avaliação de 24 horas, as doses de energia menores, 1 e 5 J, foram mais efetivas na promoção da atividade mitocondrial e, embora, as doses mais altas (10, 15 e 20 J) não foram diferentes estatisticamente também não foi observado qualquer efeito inibitório da atividade mitocondrial. De acordo com os resultados de viabilidade, já discutidos nesta experimentação, as células metabolizaram a energia entregue, transformando os fótons recebidos em sinais intracelulares de maneira positiva.

Quando induzimos, primeiramente, o estresse oxidativo nas células SH-SY5Y, seguido do tratamento com laser, os resultados obtidos foram estatisticamente significativos nas doses de energia mais elevadas (10, 15 e 20 J) na avaliação de 04 horas após o LBI, sugerindo assim serem estas as doses mais eficientes durante a fase mais aguda da oxidação celular. Na avaliação de 24 horas os resultados não mostraram qualquer diferença, sugerindo que neste período as células não estavam mais sob ação do H₂O₂, em acordo com o observado por Zabeu *et al.* (2022) e com o estudo de Ruffels, Griffin e Dickenson (2003) onde observaram que no estresse oxidativo há aumento significativo, inicialmente, da fosforilação das quinases seguidos de decréscimo da concentração destas proteínas para os níveis basais. Este resultado encontrado também está de acordo com o de Giuliani *et al.* (2009) que estudaram o modelo celular PC12 – feocromocitoma de rato submetido ao estresse oxidativo com H₂O₂ e irradiaram a amostra no espectro vermelho (670 nm, 3 mW, DE de 0.45 mJ/cm², modo contínuo e pulsado), observou aumento da atividade mitocondrial e alongamento dos neuritos proporcional a viabilidade celular.

Embora nossos resultados demostrem, inicialmente, que na avaliação de 04 horas as doses mais elevadas apresentaram efeitos mais significativos e, em concordância com estudo

realizado por Sharma *et al.* (2001) – que em seu trabalho submeteu neurônios corticais primários a TLBI (810 nm, DE de 0.03, 0.3, 3, 10 e 30 J/cm²) e demonstrou que altas doses aumentam EROs significativamente e diminuem a atividade mitocondrial de modo impactante para viabilidade celular, levando a citotoxicidade – quando avaliamos as mitocôndrias das células SH-SY5Y induzidas ao estresse oxidativo e tratadas com TLBI, através de marcação de fluorescência (teste Mitotracker), foi possível observar que não ocorreram alterações estruturais nesta organela. O que se observou foi um aumento na atividade das mitocôndrias após a TLBI, as quais se apresentam na microscopia de fluorescência, mais alongadas e filamentosas, mantendo o núcleo celular íntegro na comparação com o grupo controle (Figura 11 C, D e E). No grupo controle, que não recebeu qualquer irradiação, as mitocôndrias se apresentam com aspecto granular (Figura 11, A). Esta observação estrutural das mitocôndrias, quando sua atividade está elevada, corrobora com o estudo de Bortoletto *et al.* (2004) que irradiou cultura celular de carcinoma de traqueia humana (Hep 2) (635 nm, DE de 10 mJ/cm², nos tempos de irradiação de 100, 150 e 200 segundos) e obteve em seus resultados de avaliação da atividade mitocondrial o mesmo que observamos em nosso experimento nas doses mais altas da TLBI, 10 J (DE 93,02 J/cm²) e 15 J (DE 139, 53 J/cm²).

Em Silveira *et al.* (2019) que avaliou a atividade mitocondrial após a irradiação laser (660 nm, 30 mW, DE de 10, 30 e 60 J/cm²) em amostras de mitocôndrias extraídas de cultura celular de músculo esquelético e cérebro de ratos, observou que a TLBI nas mitocôndrias isoladamente induz alterações na transcrição e tradução mitocondrial, aumento de reações em cascata de vários componentes da cadeia respiratória, como os citocromos dos complexos I e II, principalmente nas mitocôndrias do tecido de cérebro de rato. A enzima Citocromo C Oxidase do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, tanto de células do músculo esquelético como do cérebro de ratos, foram as mais ativadas nas dosagens mais elevadas (60 J/cm²) observado no estudo de Silveira *et al.* (2019), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Este estímulo mitocondrial se reflete em aumento da síntese de ATP, redução na liberação de EROs, aumento da atividade da creatina quinase e hexoquinase, e elevação da produção de antioxidantes, como mostrou Avni *et al.* (2005) em seu trabalho, *in vivo*, irradiando músculo gastrocnêmio de ratos (810 nm, 400 mW, DP de 1.4, 2.8 e 4.5 mW/cm²) e avaliaram a elevação de proteína creatina fosfoquinase e antioxidantes totais no tecido irradiado. Seu resultado demonstrou, em todas as densidades de potência aplicadas, evidência no aumento da atividade enzimática de creatina quinase na amostra de músculo irradiado em comparação ao

não irradiado (controle), bem como aumento nos níveis de antioxidantes totais em até 5 vezes na comparação com o grupo controle.

Todos estes resultados são compatíveis com a avaliação de citotoxicidade feita neste experimento, pelo teste de exclusão por azul de tripano. A hipótese avaliada foi se o LBI aumentaria a atividade mitocondrial e a viabilidade celular de tal forma a levar as células SH-SY5Y a efeitos citotóxicos em algum dos parâmetros pré-estabelecidos. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diminuição da viabilidade celular ou efeitos citotóxicos para este modelo experimental, associados à ativação mitocondrial. Esta observação corrobora com os resultados publicados na literatura científica sobre efeitos secundários (KARU, 1999) e biomoduladores do metabolismo em diferentes tipos celulares e são contrários a manifestação de citotoxicidade (AGRAWAL *et al.*, 2014; ANDERS *et al.*, 2010; ANDERS *et al.*, 2015; BARBOZA *et al.*, 2014; GIULIANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2011; 2013; 2014; HAMBLIN, 2017).

As doenças neurodegenerativas, tal como Alzheimer (DA) em humanos e Doença Cognitiva Canina (DCC) em cães, são caracterizadas pelo envelhecimento e estase funcional das células do tecido neural, levando à morte celular. As manifestações clínicas dessas doenças são evidenciadas pela perda de memória recente, diminuição da cognição e outros eventos orgânicos mediados pelo SNC. Na neurodegeneração o funcionamento anormal da usina energética, que são as mitocôndrias, acarreta um distúrbio bioenergético e isquêmico do tecido neural, que é determinante para o adequado funcionamento do sistema nervoso. A demência causada nos quadros de neurodegeneração, onde há uma progressão da perda da memória está associada à diminuição do aporte energético na célula neural e consequente perda da homeostase sináptica e integridade da rede neuronal (KNOPMAN *et al.*, 2021; LEI; AYTON; BUSH, 2021). Há atrofia cortical difusa do tecido nervoso, degeneração neurovascular perdas de sistemas neurotransmissores, presença de placas senis extravasculares, compostas por agregados de proteína β -amiloide ($A\beta$) e massas neurofibrilares de proteína Tau (DE PAULA; GUIMARÃES; FORLENZA, 2009; FALCO *et al.*, 2016). A homeostase celular fica desequilibrada, os processos oxidativos, e os sistemas protetivos antioxidantes estão em mau funcionamento – reflexo da diminuição do metabolismo celular – evoluindo, consequentemente, para morte por mecanismos apoptóticos, seguido de necrose celular (SINGH *et al.*, 2019).

Assim como no DA ou DCC, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, distúrbios agudos do SNC, tal como traumas crânio encefálicos, acidente vascular cerebral, também são caracterizados pela hipóxia do tecido nervoso, que resultam no aumento do estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2009). Em função do alto consumo de oxigênio pelos neurônios, o sistema antioxidante juntamente com alto teor lipídico que o tecido nervoso apresenta, torna-o mais propenso a oxidação quando o equilíbrio de oxi-redução está perturbado (KLEIN; ACKERMAN, 2003).

As mitocôndrias exercem papel fundamental na cascata de eventos mediados a partir do fornecimento de ATP às células. Reações de redução são catalisadas por enzimas que ocorrem na via de fosforilação oxidativa. Quando há uma disfunção mitocondrial, esta via de fosforilação fica inativa e há um aumento na produção de EROs, o que leva ao desequilíbrio metabólico e causa danos às macromoléculas de DNA, lipídeos e proteínas. A produção aumentada das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), promove a morte celular programada da célula (apoptose) e em casos mais avançados a morte por necrose (SINGH *et al.*, 2019).

A busca é incessante pela comunidade científica de fármacos, terapias e tratamentos para doenças neurodegenerativas, de diferentes etiologias. Dentre as terapias já comprovadas quanto aos mecanismos que impactam benéficamente nos quadros degenerativos o Laser de Baixa Intensidade (LBI) vêm se destacando de modo promissor. O sítio principal de atuação do LBI é a Citocromo C Oxidase do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial e esta também é a organela que exerce papel de ponto inicial da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GONZALEZ-LIMA; BARKSDALE; ROJAS, 2014; ELFAWY; DAS, 2019).

Diante disso, é vasto o número de estudos acerca da interação do LBI em células do sistema nervoso (*in vitro*) e sua aplicação diretamente nos seres vivos (HASHMI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015; LAPCHACK; DE TABOADA, 2010; ABE *et al.*, 1993). Em Dos Santos Cardoso, Gonzalez-Lima e Da Silva (2021) sugerem, em seu trabalho de revisão, que o LBI melhora o aporte energético, o metabolismo hemodinâmico, reduz os níveis de substâncias inflamatórias e oxidativas, e regula o processo apoptótico das células nervosas e, em consequência disso, melhora os quadros neurodegenerativos.

Ainda assim, não há um consenso pela comunidade acadêmica acerca da dose ideal de energia a ser depositada e da frequência de aplicação da terapia neste tecido nobre, que é o sistema nervoso. Há uma variedade de parâmetros, tipos de equipamentos e modo de entrega

dos fótons, o que se sabe é que estas células respondem bem dentro da janela óptica que está compreendida dentro do espectro eletromagnético vermelho e infravermelho próximo (650 – 1060 nm) (HAMBLIN, 2019; GUTIÉRREZ–MENÉDEZ *et al.*, 2020). Além disso, não há evidências na literatura de que o LBI afete a atividade cerebral de modo adverso, mesmo em pacientes saudáveis (DOS SANTOS CARDOSO; GONZALEZ-LIMA; DA SILVA, 2021). Baseado nestes resultados acadêmicos, equipamentos destinados para esta terapia fotobiomoduladora já estão disponíveis no mercado para aplicação transcraniana não invasiva, mas ainda é premente a necessidade de estudos constantes que implicam na reconsideração das propriedades físicas do laser, de modo a melhorar a aplicação deste equipamento biomédico no tratamento de doenças neurodegenerativas (HAMBLIN, 2019; SALEHPOUR *et al.*, 2018).

9 CONCLUSÃO

Sendo a SH-SY5Y um modelo celular para estudos *in vitro* de doenças neurodegenerativas, pode-se admitir que os resultados encontrados no presente trabalho, respondeu a hipótese proposta quanto aos efeitos biomodulatórios da ação do LBI no modelo celular, não impactando na viabilidade, demonstrando que as células metabolizam a energia entregue e que não evoluíram para morte por efeitos citotóxicos. Os resultados demonstraram que a fototerapia foi efetiva na pré e pós-exposição das células ao agente oxidante e promove a ativação mitocondrial, e sugerindo assim que, em consequência, os mecanismos protetivos e antioxidantes foram efetivos para manutenção da viabilidade celular e mitocondrial.

Os resultados também mostram que, dentro das condições experimentais e dos parâmetros pré-estabelecidos para o LBI, as doses de energia entregues ao modelo celular SH-SY5Y que tiveram melhor interação foram 5, 10 e 15 J.

REFERÊNCIAS

ABE, Mamoru *et al.* Role of 830nm low reactive level laser on the growth of an implanted glioma in mice. **The Keio Journal of Medicine**, v. 42, n. 4, p. 177-179, 1993.

ABRAHAMSE, H. *et al.* Fluence and wavelength of low intensity laser irradiation affect activity and proliferation of human adipose derived stem cells: peer reviewed original article. **Medical Technology SA**, v. 24, n. 2, p. 15-20, 2010.

AGHOLME, Lotta *et al.* An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 20, n. 4, p. 1069-1082, 2010.

AGRAWAL, Tanupriya *et al.* Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. **Dose-Response**, v. 12, n. 4, p. 619-649, 2014.

AHMED, Samith *et al.* Low level laser therapy: Healing at the speed of light. **J. evol. med. dent. sci.**, v. 2, p. 7441-7463, 2013.

ALGHAMDI, Khalid M.; KUMAR, Ashok; MOUSSA, Noura A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in medical science**, v. 27, n. 1, p. 237-249, 2012.

ANDERS, Juanita *et al.* The combination of light and stem cell therapies: a novel approach in regenerative medicine. **AIP Conference Proceedings**, v. 1226, n. 1, p. 10.1063, 2010. <https://doi.org/10.1063/1.3453785>.

ANDERS, Juanita J.; LANZAFAME, Raymond J.; ARANY, Praveen R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and laser surgery**, v. 33, n. 4, p. 183-184, 2015.

ANDRADE, Almir Ferreira de *et al.* Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 75-81, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Equipamento eletromédico. Parte 2: Prescrições particulares para a segurança de equipamento terapêutico e de diagnóstico a laser.** Rio de Janeiro: ABNT, 2017 (NBR IEC 60601-2-22: 2017).

AVNI, Dorit *et al.* Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 3, p. 273-277, 2005.

BARBOZA, Carlos Augusto Galvão *et al.* Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, p. 75-81, 2014.

BARREIROS, André L.B.S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

BARRETT, Douglas W.; GONZALEZ-LIMA, F. Transcranial infrared laser stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans. **Neuroscience**, v. 230, p. 13-23, 2013.

BAXTER, G. D. Low – intensity laser Therapy. *In*: WATSON, T. **Electrotherapy Evidence-Based Practice**. 20. ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. p.161-177.

BORTOLETTO, R. *et al.* Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 4, p. 204-206, 2004.

CARRARD, V. C. *et al.* Micronucleus assay: a biomarker of genotoxic damage in exfoliated oral mucosa cells. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.

DA COSTA FURTADO, Raíssa; ZABEU, Antonieta Marques Caldeira; DA SILVA, Newton Soares. 810 nm Low-intensity laser in the treatment of degenerative articular disease associated with kinesiotherapy and chondroprotectors–Case report. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e18710615494-e18710615494, 2021.

DE OLIVEIRA, Helenita Antonia *et al.* Photobiomodulation leads to reduced oxidative stress in rats submitted to high-intensity resistive exercise. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

DE PAULA RODRIGUES, Rafael *et al.* Effect of photodynamic therapy supplemented with quercetin in HEP-2 cells. **Cell Biology International**, v. 38, n. 6, p. 716-722, 2014.

DE PAULA, Vanessa JR; GUIMARÃES, Fabiana M.; FORLENZA, Orestes V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 36, p. 197-202, 2009.

DE SOUZA DA FONSECA, Adenilson *et al.* Effect of low power lasers on prokaryotic and eukaryotic cells under different stress condition: a review of the literature. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 6, p. 1139-1150, 2021.

DIONÍSIO, P. A.; AMARAL, J. D.; RODRIGUES, C. M. P. Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. **Ageing Research Reviews**, v. 67, p. 101263, 2021.

DONG, Tingting *et al.* Low-level light in combination with metabolic modulators for effective therapy of injured brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 9, p. 1435-1444, 2015.

DOS SANTOS CARDOSO, Fabrízio; GONZALEZ-LIMA, F.; DA SILVA, Sergio Gomes. Photobiomodulation for the aging brain. **Ageing Research Reviews**, v. 70, p. 101415, 2021.

ELFAWY, Hasnaa A.; DAS, Biswadeep. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 218, p. 165-184, 2019.

ESTEVIÃO, Rua José. Laser: fundamentos e indicações em dermatologia. **Med. Cutan. Iber. Lat. Am.**, v. 37, n. 1, p. 5-27, 2009.

EVANS, Denise Hawkins; ABRAHAMSE, Heidi. A review of laboratory-based methods to investigate second messengers in low-level laser therapy (LLLT). **Medical Laser Application**, v. 24, n. 3, p. 201-215, 2009.

FALCO, Anna de *et al.* Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, p. 63-80, 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GAO, Xuejuan; XING, Da. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2009.

GHAEMI, Marjan *et al.* Comparison and evaluation of the low-level laser and the red and blue LED effects on wound healing in rabbit. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 189, 2019.

GILLE, J. J. P.; JOENJE, H. Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 405-414, 1992.

GIULIANI, Alessandro *et al.* Low infra-red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2009.

GONZALEZ-LIMA, F.; BARKSDALE, Bryan R.; ROJAS, Julio C. Mitochondrial respiration as a target for neuroprotection and cognitive enhancement. **Biochemical pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 584-593, 2014.

GRANATO, Alessandro EC *et al.* Polypyrrole increases branching and neurite extension by Neuro2A cells on PBAT ultrathin fibers. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 6, p. 1753-1763, 2018.

GUTIÉRREZ-MENÉNDEZ, Alba *et al.* Photobiomodulation as a promising new tool in the management of psychological disorders: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 119, p. 242-254, 2020.

HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337, 2017.

HAMBLIN, Michael R. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: has the light dawned? **Photonics**, v.6, n. 3, p. 77, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/photonics6030077>

HART, Graham. Dental lasers: principles and practice of safety. **Dental Nursing**, v. 10, n. 4, p. 208-211, 2014.

HASHMI, Javad T. *et al.* Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **Pm&r**, v. 2, p. S292-S305, 2010a.

HASHMI, Javad T. *et al.* Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 42, n. 6, p. 450-466, 2010b.

HENRIQUES, Águida Cristina Gomes; CAZAL, Claudia; CASTRO, Jurema Freire Lisboa de. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

HUANG, Chunhui; YAN, Sen; ZHANG, Zaijun. Maintaining the balance of TDP-43, mitochondria, and autophagy: A promising therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2020.

HUANG, Ling *et al.* Intracellular amyloid toxicity induces oxytosis/ferroptosis regulated cell death. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 10, p. 1-13, 2020.

HUANG, Ying-Ying *et al.* Biphasic dose response in low level light therapy—an update. **Dose-response**, v.9, n.4, p.602-618, 2011.

HUANG, Ying-Ying *et al.* Low-level laser therapy (810 nm) protects primary cortical neurons against excitotoxicity in vitro. **Journal of biophotonics**, v. 7, n. 8, p. 656-664, 2014.

HUANG, Ying-Ying *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **Journal of biophotonics**, v. 6, n. 10, p. 829-838, 2013.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 27, n. 3, p. 219-223, 1995.

KARU, Tiina I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **IUBMB life**, v. 62, n. 8, p. 607-610, 2010.

KARU, Tiina. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.

KLEIN, Jeffrey A.; ACKERMAN, Susan L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 6, p. 785-793, 2003.

KNOPMAN, David S. *et al.* Alzheimer disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2021.

KOVALEVICH, Jane; SANTERRE, Maryline; LANGFORD, Dianne. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *In: AMINI, Shohreh; WHITE , Martyn K. Neuronal Cell Culture*. New York, NY: Humana, 2021. p. 9-23.

LAPCHAK, Paul A.; DE TABOADA, Luis. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. **Brain research**, v. 1306, p. 100-105, 2010.

LEI, Peng; AYTON, Scott; BUSH, Ashley I. The essential elements of Alzheimer's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100105, 2021. Doi: 10.1074/jbc.rev120.008207

LI, Shasha *et al.* Clinical utility of brain stimulation modalities following traumatic brain injury: current evidence. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p. 1573, 2015.

LIANG, Jiangang; LIU, Lei; XING, Da. Photobiomodulation by low-power laser irradiation attenuates A β -induced cell apoptosis through the Akt/GSK3 β / β -catenin pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1459-1467, 2012.

LIEBERT, Ann D.; BICKNELL, Brian T.; ADAMS, Roger D. Protein conformational modulation by photons: a mechanism for laser treatment effects. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 3, p. 275-281, 2014.

LINS, Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa *et al.* Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

MACÊDO, Williams J. C. *et al.* High-Throughput-Based Virtual Screening via Molecular Docking for Oxidative Stress Mediated by ROS Enzyme. *In*: LA PORTA, Felipe A.; TAFT, Carlton A. (Eds.). **Functional Properties of Advanced Engineering Materials and Biomolecules**. Cham: Springer, 2021. p. 489-513. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62226-8_17

MADARI, Aladar *et al.* Assessment of severity and progression of canine cognitive dysfunction syndrome using the Canine Dementia Scale (CADES). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 138-145, 2015.

MAIURI, T. *et al.* DNA damage repair in Huntington's disease and other neurodegenerative diseases. **Neurotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 948-956, 2019.

MARTIN, Lee J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 107, p. 355-415, 2012.

MCCORD, Joe M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American journal of medicine**, v. 108, n. 8, p. 652-659, 2000.

MELLOR, David J. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “a Life Worth Living”. **Animals**, v. 6, n. 3, p. 21, 2016.

MENG, Chengbo; HE, Zhiyong; XING, Da. Low-level laser therapy rescues dendrite atrophy via upregulating BDNF expression: implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 33, p. 13505-13517, 2013.

MESTER, Andrew; MESTER, Adam. The history of photobiomodulation: Endre Mester (1903–1984). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 8, p. 393-394, 2017.

MIGLIARIO, Mario *et al.* Near infrared laser irradiation induces NETosis via oxidative stress and autophagy. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 9, p. 1919-1924, 2018.

MOCHIZUKI-ODA, Noriko *et al.* Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. **Neuroscience letters**, v. 323, n. 3, p. 207-210, 2002.

MOORE, Pete *et al.* Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 2005.

MOREIRA, Maria S. *et al.* Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 207-215, 2011.

MURAYAMA, Hideyuki *et al.* Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. **Lasers in medical science**, v. 27, n. 1, p. 87-93, 2012.

NEUS BOSCH, Maria *et al.* Dogs with cognitive dysfunction syndrome: a natural model of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 3, p. 298-314, 2012.

NIRMALADEVI, D. *et al.* Neuroprotective effects of bikaverin on H₂O₂-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 34, n. 7, p. 973-985, 2014.

ORON, U. *et al.* Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 3, p. 180-182, 2007.

PARK, Hee Ra *et al.* Neuroprotective effects of Liriope platyphylla extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.

REPETTO, Guillermo; DEL PESO, Ana; ZURITA, Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

ROCHKIND, Shimon *et al.* Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 277-281, 2009.

ROJAS, Julio C.; GONZALEZ-LIMA, F. Low-level light therapy of the eye and brain. **Eye and brain**, v. 3, p. 49, 2011.

ROJAS, Julio C.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 447-457, 2013.

RUFFELS, James; GRIFFIN, Martin; DICKENSON, John M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. **European journal of pharmacology**, v. 483, n. 2-3, p. 163-173, 2004.

SAFIAN, Fereshteh *et al.* Photobiomodulation with 810 nm wavelengths improves human sperms' motility and viability in vitro. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 38, n. 4, p. 222-231, 2020.

SAKAGUCHI, Reiko; MORI, Yasuo. Transient receptor potential (TRP) channels: Biosensors for redox environmental stimuli and cellular status. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 146, p. 36-44, 2020.

SALEHPOUR, Farzad *et al.* Brain photobiomodulation therapy: a narrative review. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6601-6636, 2018.

SALLES, Geisa Nogueira *et al.* A novel bioresorbable device as a controlled release system for protecting cells from oxidative stress from Alzheimer's Disease. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 9, p. 6827-6838, 2017.

SAXENA, Shekhar; SETOYA, Yutaro. World Health Organization's Comprehensive Mental Health Action Plan 2013–2020. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 68, n. 8), p. 585-586, 2014.

SHARMA, Sulbha K. *et al.* Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 8, p. 851-859, 2011.

SILVEIRA, Paulo Cesar Lock *et al.* Effects of photobiomodulation on mitochondria of brain, muscle, and C6 astrogloma cells. **Medical engineering & physics**, v. 71, p. 108-113, 2019.

SINGH, Anju *et al.* Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1583, 2019.

SOARES, Cristina Pacheco *et al.* Avaliação de proteínas de choque térmico em células neoplásicas de laringe (HEP-2) após tratamento fotodinâmico. **Revista Univap**, v. 25, n. 48, p. 43-63, 2019.

SOMMER, Andrei P. Revisiting the photon/cell interaction mechanism in low-level light therapy. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 37, n. 6, p. 336-341, 2019.

SWERDLOW, Russell H.; BURNS, Jeffrey M.; KHAN, Shaharyar M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s2, p. S265-S279, 2010.

SWERDLOW, Russell H.; PARKER, Davis W. Cybrids in Alzheimer's disease: A cellular model of the disease? **Neurology**, v. 51, n. 1, p. 326-327, 1998.

TERENA, Stella Maris Lins *et al.* Photobiomodulation alters the viability of HUVECs cells. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 1, p. 83-90, 2021.

TORRÃO, Andréa S. *et al.* Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 34, p. s194-s205, 2012.

TSAI, Shang-Ru; HAMBLIN, Michael R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 197-207, 2017.

UTTARA, Bayani *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VAN MUISWINKEL, Freek L.; KUIPERIJ, H. Bea. The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. **Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, v. 4, n. 3, p. 267-281, 2005.

VOLPATO, Luiz Evaristo Ricci *et al.* Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 7, p. 075004, 2011.

VON LEDEN, Ramona E. *et al.* 808 nm Wavelength Light Induces a Dose-Dependent Alteration in Microglial Polarization and Resultant Microglial Induced Neurite Growth. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 45, n. 4, p. 253-263, 2013.

WANG, Lina *et al.* Modulation of extracellular ATP content of mast cells and DRG neurons by irradiation: studies on underlying mechanism of low-level-laser therapy. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025**. Geneva, Switzerland: WHO, 2017.

WU, Xingjia *et al.* 810 nm Wavelength light: an effective therapy for transected or contused rat spinal cord. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 36-41, 2009.

WU, Xingjia *et al.* Comparison of the effects of pulsed and continuous wave light on axonal regeneration in a rat model of spinal cord injury. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 2, p. 525-528, 2012.

XICOY, Helena; WIERINGA, Bé; MARTENS, Gerard JM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2017.

XUAN, Weijun *et al.* Transcranial low-level laser therapy improves neurological performance in traumatic brain injury in mice: effect of treatment repetition regimen. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53454, 2013.

XUN, Zhiyin *et al.* Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, n. 4, p. 176-185, 2012.

YAZDANI, Saeed Oraee *et al.* Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 107, p. 9-13, 2012.

ZABEU, Antonieta Marques Caldeira *et al.* Biomodulatory effect of low intensity laser (830 nm.) in neural model 9L/lacZ. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e11310817025-e11310817025, 2021.

ZABEU, Antonieta Marques Caldeira *et al.* Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e30811326474-e30811326474, 2022.

ZAIJAR, Eric D.; GONZALEZ-LIMA, F.; TELCH, Michael J. Singular and combined effects of transcranial infrared laser stimulation and exposure therapy: A randomized clinical trial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 72, p. 95-102, 2018.

ZANINI, Rachel Schlindwein. Demência no idoso: aspectos neuropsicológicos. **Revista Neurociências**, v. 18, n. 2, p. 220-226, 2010.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

CARNEVALLI, Célia MM et al. Laser light prevents apoptosis on Cho K-1 cell line. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 21, n. 4, p. 193-196, 2003.

DA SILVA OLIVEIRA, Victória Regina; SANTOS-EICHLER, Rosangela Aparecida; DALE, Camila Squarzoni. Photobiomodulation increases cell viability via AKT activation in an in vitro model of diabetes induced by glucose neurotoxicity. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 1, p. 149-156, 2020.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAMBLIN, Michael R. Shining light on the head: photobiomodulation for brain disorders. **BBA clinical**, v. 6, p. 113-124, 2016.

KARU, Tiina; PYATIBRAT, Ludmila. Gene expression under laser and light-emitting diodes radiation for modulation of cell adhesion: Possible applications for biotechnology. **IUBMB life**, v. 63, n. 9, p. 747-753, 2011.

RIBEIRO, Beatriz Guimaraes et al. Red and infrared low-level laser therapy prior to injury with or without administration after injury modulate oxidative stress during the muscle repair process. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153618, 2016.

SHEN, Chiung-Chyi et al. Low-level laser stimulation on adipose-tissue-derived stem cell treatments for focal cerebral ischemia in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on the public health response to dementia. 2021.

APÊNDICE A - TRABALHOS EM CONGRESSOS

- i. Trabalho "*Identificação da molécula de Rosuvastatina Cálcica na concentração de 10 mg. e 5mg. por FT-IR*". publicado como capítulo do livro Condições Teórico-Práticas da Biomedicina no Brasil, Ed Atena, Capítulo 1, pg. 1 - 8. ISBN 978-65-5706-964-6, DOI 10.22533/at.ed.646210604.
- ii. Trabalho apresentado no congresso Laser in Florence 2019, 30 Th. Edition – Florença, Itália., sob título "*Need of drug therapy rescue in post-operative of orthopedic surgery with LLLT*"
 - iii. Trabalho apresentado oralmente ao congresso CBEB 2020 – Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, sob título "*Photobiomodulation therapy (PBMT) increases the viability of human neuroblastoma (SH-SY5Y)*"
 - iv. Trabalho apresentado na XXI Conferência Anual da Abraveq 2021 – Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos, sob título "*Uso do Laser de baixa intensidade (LBI) no reparo de lesão tendínea e ligamentar de equino de alta performance*".
 - v. Trabalho apresentado no Congresso da AAIC 2021 – Alzheimer's Association International Conference. Este trabalho foi apresentado oralmente, sob título "*Photobiostimulating human neuroblastoma mitochondria with low-level laser therapy (LLLT) at different parameters*" DOI: <https://doi.org/10.1002/alz.054374>

APENDICE B - ARTIGOS PUBLICADOS

- i.* Artigo publicado sob título “*Biomodulatory effect of low intensity laser (830 nm.) in neural model 9L/lacZ*” no periódico **Research, Society and Development**, DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17025>
- ii.* Artigo publicado sob título “810 nm Low-intensity laser in the treatment of degenerative articular disease associated with kinesiotherapy and chondroprotectors – case report” no periódico **Research, Society and Development**, DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15494>
- iii.* Artigo aceito para publicação em 16.02.22 sob título “*Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio*”, no periódico **Research, Society and Development**. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26474>