

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

Larissa Cavallieri Segismondi

**Efeito sinérgico da fotobiomodulação com LED 660 E 850 nm em células L929
induzidas ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio**

**Synergistic effect of photobiomodulation with 660 and 850 nm LED in L929
cells induced to oxidative stress with hydrogen peroxide**

São José dos Campos, SP

2025

LARISSA CAVALLIERI SEGISMONDI

**EFEITO SINÉRGICO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED 660 E 850 nm EM
CÉLULAS L929 INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO COM PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Silva Soares
Coorientadora: Prof.^a Dra. Cristina Pacheco-Soares

São José dos Campos, SP
2025

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Segismondi, Larissa Cavallieri

Efeito sinérgico da fotobiomodulação com LED 660 E 850 nm em células L929 induzidas ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio / Larissa Cavallieri Segismondi; orientador, Luís Eduardo Silva Soares ; co-orientadora Cristina Pacheco-Soares. - São José dos Campos, SP, 2025.

52 p.

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

Inclui referências

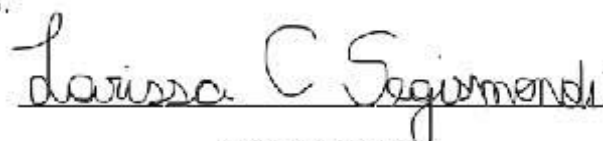
1. Engenharia Biomédica. 2. Fibroblastos. 3. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. 4. Estresse oxidativo. I. Soares, Luís Eduardo Silva, orient. II. Pacheco-Soares, Cristina, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Larissa Cavallieri Segismondi, 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, 9 de Setembro de 2025.







Autor(a) da Obra

LARISSA CAVALLIERI SEGISMONDI

**“EFEITO SINÉRGICO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED 660 E 850 nm EM CÉLULAS L929
INDUZIDAS AO ESTRESSE OXIDATIVO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, 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. Dr. Luís Eduardo Silva Soares	
Prof.ª Dr.ª Cristina Pacheco Soares	
Prof.ª Dr.ª Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	
Prof.ª Dr.ª Luciane Dias de Oliveira (Unesp)	

Prof.ª Dr.ª Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 04 de agosto de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, aquelas que estiveram ao meu lado por todos os dias ao longo desses dois anos.

Dedico à minha mãe, Adele, como forma de agradecimento por todo o seu amor, dedicação, esforço e educação que me proporcionou durante toda a minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por ser minha incentivadora, apoiar os meus sonhos, ser minha melhor amiga, colega de profissão e meu maior exemplo de vida. Te amo infinitamente. Este trabalho é para você!

Dedico ao meu marido, Sandro, como forma de agradecimento por todo o seu amor, apoio, incentivo e parceria. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por ser o meu porto seguro, me fazer enxergar o lado bom das coisas e nunca me deixar desistir. Te amo para sempre. Este trabalho também é para você!

Dedico a um serzinho muito especial que me deixou nesse último ano. Max, sua companhia ao longo de 14 anos marcou a minha vida para sempre. Obrigada pelo seu amor tão puro e por ter alegrado todos os meus dias. Te amo para sempre, você sempre está nos meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Eduardo Silva Soares, por ter aberto as portas do IP&D para mim, por toda a disponibilidade, paciência e dedicação ao me orientar, e por todo o conhecimento que me foi passado.

Agradeço à minha co-orientadora, Prof.^a Dra Cristina Pacheco-Soares, por sempre ter me recebido maravilhosamente bem em seu laboratório, por todo aprendizado e ajuda com os experimentos, por toda paciência e por ter me acalmado nos momentos mais difíceis.

Agradeço à duas companhias que foram fundamentais durante todo esse processo, meus amigos de laboratório Mariela Santos e Erick Nogueira. Obrigada pela amizade de todos os dias, pela ajuda em todas as rodadas de experimentos, por também me ensinarem muito do que aprendi, por todos os almoços, manhãs e tardes com muitas risadas, pelos momentos de dificuldade que vocês me acudiram e me incentivaram a não desistir. Sem o apoio e companhia de vocês não teria sido possível.

Agradeço à minha colega de laboratório Geisa Salles por todo o auxílio durante os experimentos.

Agradeço à Prof.^a Dra. Josne Paterno por todo o auxílio desde a graduação.

Por fim, agradeço a mim mesma, pelo desejo de evoluir, por não ter desistido, e por ter enfrentado esse desafio ao longo de dois anos que foram tão intensos em minha vida!

RESUMO

A pele está constantemente exposta a agressões externas, tornando-se um alvo para a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), que induzem danos oxidativos principalmente na região dérmica. A fotobiomodulação (FBM) mostra-se uma terapia eficiente para biomodulação de sistemas biológicos, capaz de modular processos oxidativos e inflamatórios. No presente estudo, buscou-se elucidar o possível efeito fotoprotetor *in vitro* da aplicação simultânea da FBM com LED 660 e 850 nm em células fibroblásticas L929 diante do tratamento com peróxido de hidrogênio como modelo de estresse oxidativo. Os fibroblastos foram pré-irradiados com LED e em seguida incubados com 200 µM de H₂O₂ diluído em meio de cultura pelo período de 3 horas. Após 24 horas dos tratamentos, foram observadas alterações quanto à atividade mitocondrial pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue e quanto à morfologia celular por microscopia invertida. Também foi realizada a marcação de mitocôndrias e núcleos em células vivas por fluorescência utilizando Tetrametilrodamina (TMRM) e Tricloridrato de bisbenzimidazol (HOESCHT), além da detecção de ROS por fluorescência utilizando CellRox Orange. Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento com LED promove aumento da atividade mitocondrial, do potencial da membrana mitocondrial, redução da geração de ROS intracelular e induz alterações morfológicas nas células. Dessa maneira, conclui-se que o sinergismo entre os LEDs 660 e 850 nm exerce efeito protetor contra a ação do H₂O₂ em células fibroblásticas L929, demonstrando que a FBM pode ser utilizada para auxiliar a prevenir e mitigar danos oxidativos.

Palavras-chave: Fibroblastos; Fotobiomodulação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The skin is constantly exposed to external aggressions, becoming a target for the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which induce oxidative damage, mainly in the dermal region. Photobiomodulation (PBM) has proven to be an effective therapy for biomodulating biological systems, capable of modulating oxidative and inflammatory processes. In the present study, we sought to elucidate the possible *in vitro* photoprotective effect of the simultaneous application of PBM with 660 and 850 nm LEDs on L929 fibroblast cells treated with hydrogen peroxide as a model of oxidative stress. The fibroblasts were pre-irradiated with LED and then incubated with 200 μ M H₂O₂ diluted in culture medium for 3 hours. After 24 hours of treatment, changes in mitochondrial activity were observed using the Alamar Blue colorimetric assay and in cell morphology using inverted microscopy. Mitochondria and nuclei were also fluorescently labeled in living cells using tetramethylrhodamine (TMRM) and bisbenzimidazole trihydrochloride (HOESCHT), in addition to ROS detection using CellRox Orange. The results indicate that LED pretreatment promotes increased mitochondrial activity and membrane potential, reduced intracellular ROS generation, and induced morphological changes in the cells. Thus, it is concluded that the synergism between 660 and 850 nm LEDs exerts a protective effect against the action of H₂O₂ in L929 fibroblast cells, demonstrating that PBM can be used to help prevent and mitigate oxidative damage.

Keywords: Fibroblast; Photobiomodulation; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares da pele jovem e envelhecida	16
Figura 2. Nível de penetração da luz de acordo com seu comprimento de onda.....	20
Figura 3. Dispositivo para irradiação LED Sportllux Ultra (Cosmedical®)	27
Figura 4. Irradiação da placa de cultura celular.....	27
Figura 5. Porcentagem de atividade mitocondrial das células L929 após diferentes tempos de incubação com H ₂ O ₂ . Grupo H ₂ O ₂ 1H incubado com 200 µM de H ₂ O ₂ de por 1 hora e grupo H ₂ O ₂ 3H incubado com 200 µM de H ₂ O ₂ por 3 horas. *p<0,05	30
Figura 6. Porcentagem de atividade mitocondrial das células L929 após os tratamentos com LED e/ou H ₂ O ₂ . Grupo controle (sem tratamento), grupo LED irradiado simultaneamente em 660 e 850 nm, grupo LED + H ₂ O ₂ pré-irradiado simultaneamente em 660 e 850 nm e incubado com 200 µM de H ₂ O ₂ por 3 horas e grupo H ₂ O ₂ incubado com 200 µM de H ₂ O ₂ por 3 horas. *p=0,001	31
Figura 7. Visualização das células por microscopia invertida. O grupo controle (A) e o grupo LED (B) apresentaram células com formato fusiforme (setas pretas) e células arredondadas (setas brancas). O grupo C apresenta restos celulares (estrelas pretas) ao fundo da fotomicrografia.....	32
Figura 8. Avaliação das mitocôndrias e núcleo celular por meio da marcação de fluorescência. Algumas células do grupo controle (A), grupo LED (B) e grupo LED+H ₂ O ₂ (D) apresentaram pontos de condensação da cromatina (setas brancas). O grupo LED+H ₂ O ₂ (D) apresentou células no processo de divisão celular (seta amarela).....	34
Figura 9. Visualização de mitocôndrias gigantes por meio da marcação de fluorescência no grupo LED (B).....	36
Figura 10. Avaliação de ROS por meio da marcação de fluorescência. Algumas células do grupo LED (B) e grupo LED+H ₂ O ₂ (D) apresentaram morfologia espalhada e alongada (setas brancas). O grupo H ₂ O ₂ (C) apresentou alta emissão de fluorescência (seta laranja).	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	A PELE.....	13
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	14
2.3	FOTOBIMODULAÇÃO.....	18
2.4	FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	LINHAGEM CELULAR L929	25
4.2	INDUÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO	25
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	26
4.4	IRRADIAÇÃO	26
4.5	ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL	28
4.6	MORFOLOGIA CELULAR	28
4.7	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	28
4.7.1	NÚCLEO E MITOCÔNDRIAS CELULARES	28
4.7.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	29
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5	RESULTADOS.....	30
5.1	ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL – H ₂ O ₂	30
5.2	ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL – LED E H ₂ O ₂	31
5.3	MORFOLOGIA CELULAR	32
5.4	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	33
5.4.1	NÚCLEO E MITOCÔNDRIA.....	33

5.4.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	36
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo vem sendo pesquisado há 40 anos, este decorrente do desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que acarreta danos celulares e teciduais. As ROS podem ser induzidas por fontes exógenas como: poluição, tabaco e radiação ultravioleta. Sabe-se que os danos mediados por ROS se acumulam em função da idade e estão associados a doenças degenerativas do envelhecimento, senescência e carcinogênese (Pizzino *et al.*, 2017; Sarsour *et al.*, 2009; Sies, 2015).

Por estar constante exposta a agressões externas, a pele é um alvo para a geração ROS (Jaffri, 2023), que induzem danos ao DNA, promovem a peroxidação de membranas lipídicas e a síntese e ativação de metaloproteinasas da matriz (MMPs) responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo, dessa maneira, induzindo e acelerando o processo de envelhecimento da pele (Garg; Sharma; Garg, 2020; Gu *et al.*, 2020).

Na pele envelhecida têm-se o acúmulo de fibroblastos senescentes que desempenham papel fundamental na exacerbação do envelhecimento, bem como na amplificação da inflamação pela produção de citocinas, quimiocinas e outros fatores (ZHANG *et al.*, 2024a). Clinicamente, essa pele irá apresentar hiperpigmentação, rugas, flacidez, desidratação e despigmentação. Podem ainda haver manifestações como cicatrizes, formação de fibroses, e neoplasias benignas e malignas (Garg; Sharma; Garg, 2020).

Têm-se demonstrado que a fotobiomodulação (FBM), amplamente utilizada na prática clínica como uma abordagem não invasiva no tratamento de diversas doenças, pode modular a inflamação, exercer efeito antioxidante e auxiliar na reparação celular. FBM com LED fornece luz terapêutica em comprimentos de onda do espectro de luz visível, como a luz vermelha (RL, 620–700 nm), e além da faixa da luz visível, como o infravermelho próximo (NIR, 700–1100 nm) (Couturaud *et al.*, 2023; Kim; Won, 2022; Yang *et al.*, 2022).

As aplicações clínicas da FBM para fotorejuvenescimento da pele entregam resultados como redução da profundidade de rugas e linhas de expressão, suavização de discromias, redução no diâmetro dos poros, aumento da densidade dérmica e regulação da oleosidade. A FBM também pode ser aplicada como terapia coadjuvante

no manejo de outras condições dermatológicas como acne vulgar, dermatite atópica e lesões psoriáticas (Couturaud *et al.*, 2023; Glass, 2021; Zhang; Wu, 2017).

A mitocôndria é uma organela chave na FBM, dado que em sua unidade IV da cadeia respiratória está localizada a enzima citocromo c oxidase, que atua como cromóforo primário para absorção da luz (Dompe *et al.*, 2020). A excitação do cromóforo resulta na atividade de várias moléculas como o óxido nítrico, ATP, íons de cálcio, ROS e moléculas de sinalização, influenciando vias bioquímicas com potencial de exercer um efeito terapêutico, surgindo assim como uma potencial terapia na mitigação de danos provocados por ROS (Dompe *et al.*, 2020; Kim; Won, 2022; Rossato *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2022).

Dado que a senescência celular dos fibroblastos pode desempenhar um papel importante no envelhecimento da pele, no envelhecimento do organismo como um todo e provavelmente em muitas doenças relacionadas ao envelhecimento, os fibroblastos são um ótimo modelo para explorar a relação entre senescência celular, alterações cutâneas e doenças relacionadas ao envelhecimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PELE

A pele, o maior órgão do corpo humano, é dividida em duas regiões sobrepostas: a epiderme e a derme. A derme é formada por tecido conjuntivo, este constituído principalmente por matriz extracelular (MEC) e uma população de células que podem ser fixas ou migrantes, como: fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, adipócitos e leucócitos. O tecido conjuntivo exerce funções importantes relacionadas a suporte, defesa, modulação, sobrevivência, migração, função e direcionamento de atividades mitóticas das células (Gartner; Hiatt, 2003; Junqueira; Carneiro, 2013).

Os fibroblastos são as células em maior quantidade no tecido conjuntivo, responsáveis pela síntese e secreção de componentes da MEC como fibras colágenas, reticulares e elásticas, além das proteoglicanas e glicoproteínas, estando intimamente envolvidos no processo de cicatrização de feridas e na produção de fatores de crescimento que controlam o crescimento e diferenciação celular. Em sua morfologia clássica, os fibroblastos apresentam forma alongada, com longos prolongamentos, núcleo eucromático e um ou dois nucléolos proeminentes (Gartner; Hiatt, 2003; Junqueira; Carneiro, 2013; 2014; Reilly; Lozano, 2021).

Por estar constantemente exposta a agressões externas, ao longo dos anos, a pele sofre alterações provocadas pelo envelhecimento intrínseco, ou cronológico, e o envelhecimento extrínseco, induzido por fatores ambientais como a luz ultravioleta (UV), poluição e tabagismo (ZHANG *et al.*, 2024a). Este processo de envelhecimento promove alterações estruturais dermoepidérmicas, induzindo o surgimento de características clínicas proeminentes do envelhecimento, como aparência enrugada e flácida da pele. Estes sinais estão diretamente relacionados à perda dos componentes da MEC e à síntese reduzida e degradação aumentada da MEC em fibroblastos envelhecidos. Sabe-se que aproximadamente 1% da síntese de colágeno e elastina é diminuída por ano (Chaudhary, Khan, Gupta, 2020). Dessa maneira, a espessura, a qualidade e a capacidade viscoelástica da pele dependem da quantidade de material presente na derme e de sua organização estrutural (Oriá *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2024a)

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Ao longo dos anos existiram diversas teorias para explicar o envelhecimento. Entre as teorias propostas para explicar o envelhecimento biológico, a teoria do envelhecimento pelo estresse oxidativo foi uma das mais aceitas e estudadas (Simas; Granzoti; Porsch, 2019).

O conceito de “estresse oxidativo” surgiu em 1985, sendo definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em que ocorre geração excessiva de radicais livres ou redução da velocidade de remoção dos mesmos. Este desequilíbrio leva à oxidação de biomoléculas, com conseqüente perda de funções biológicas e/ou desregulação da homeostase (Barbosa *et al.*, 2010; Sies, 2015).

Os mecanismos oxidativos estão ligados às espécies reativas de oxigênio (ROS), subprodutos de processos metabólicos que são altamente reativos. Durante a produção de energia mitocondrial, o oxigênio é parcialmente convertido em espécies reativas de oxigênio e, quando a produção de ROS excede a sua degradação, denominamos estresse oxidativo (Simas; Granzoti; Porsch, 2019).

As ROS podem ser divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares. Enquanto os radicais livres apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, os compostos não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não possuem elétrons livres (Martelli; Nunes, 2014).

O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio altamente tóxico para células, capaz de atravessar camadas lipídicas de membranas plasmáticas. É utilizado como um modelo de estresse oxidativo para diversos tipos de células, incluindo linhagens celulares, células tumorais e células neuronais. É um modelo rápido e apresenta bom custo-benefício para avaliar a suscetibilidade celular ao estresse oxidativo, estimulando a capacidade das células de lidar com um ambiente desfavorável (Rossato *et al.*, 2024; Zabeu *et al.*, 2022).

São descritos diversos eventos relacionados a ROS, incluindo: envelhecimento, mutações, doenças neurológicas, doenças autoimunes e doenças metabólicas (Ferreira; Matsubara, 1997). A nível celular, ocorre o encurtamento dos telômeros, disfunção mitocondrial e danos ao DNA, levando a danos permanentes ou transitório e parada do ciclo celular (Csekes; Rackova, 2021). Todavia, vale ressaltar que, embora seja deletério, em baixas concentrações, o H_2O_2 provoca um estresse

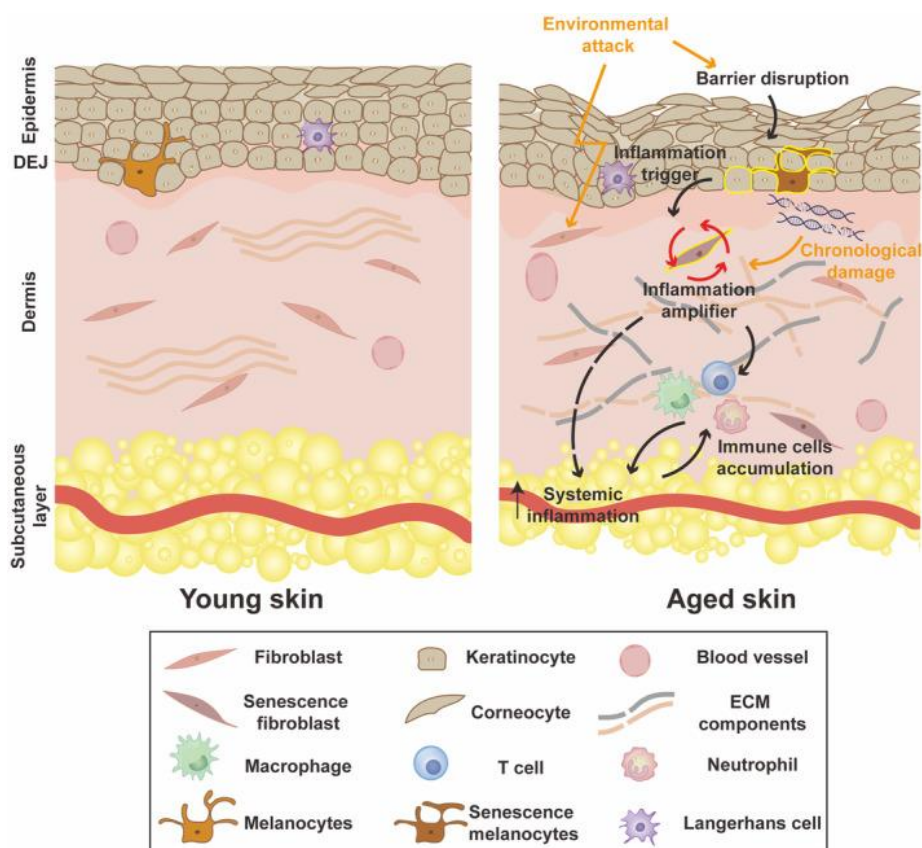
oxidativo leve, controlado e transitório, atuando como um mensageiro intracelular que ativa diferentes vias metabólicas (Facchin *et al.*, 2018; Ferreira; Matsubara, 1997).

Além de induzir danos em diversas biomoléculas, as ROS ativam vias de sinalização que acarretam o afinamento da epiderme, hiperpigmentação, redução da produção de colágeno e elastina, e a síntese e ativação de metaloproteinases da matriz (MMPs) responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo, que resultam na manifestação de vários fenótipos de envelhecimento (Gu *et al.*, 2020).

Ainda, o acúmulo de ROS induz a liberação aumentada do fenótipo secretor associado a senescência (SASP), que consiste em uma secreção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de remodelação da matriz que alteram o microambiente das células e contribuem para a inflamação crônica e o câncer (Ohtani, 2022).

No envelhecimento da pele, têm-se o acúmulo de fibroblastos senescentes, células imunes excessivas e componentes fragmentados da MEC. Os fibroblastos podem receber sinais de envelhecimento por meio de ações parácrinas, como células vizinhas, como queratinócitos e melanócitos, ou por meio da secreção autócrina SASP induzida por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo o acúmulo de ROS. Os fibroblastos senescentes desempenham um papel fundamental na exacerbação do envelhecimento cutâneo, bem como na amplificação da inflamação pela produção de citocinas, quimiocinas e outros fatores. Isso atrai e ativa células imunes, levando à inflamação não apenas na pele, mas também potencialmente em outras partes do corpo (Figura 1) (ZHANG *et al.*, 2024a).

Figura 1. Componentes celulares da pele jovem e envelhecida



Fonte: Zhang *et al.*, 2024a

Diferentes estudos utilizam o H_2O_2 para induzir o estresse oxidativo no modelo celular L929. Chen e Ames (1994) trataram fibroblastos com $200 \mu M$ de H_2O_2 por 2 horas. As células entraram em senescência pela perda da capacidade de sintetizar DNA e reentrar no ciclo celular, que demonstrou ser acumulativa e irreversível. As células também não responderam a uma variedade de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento fibroblástico básico e fator de crescimento epidérmico.

Lee *et al.* (2003) investigaram os efeitos do estresse oxidativo e do mecanismo apoptótico em células L929. O tratamento com $100 \mu M$ de H_2O_2 induziu apoptose pela fragmentação de DNA nas células, ocorrendo de maneira dependente do tempo e da dose de H_2O_2 utilizada. Os autores constataram que o tratamento com peróxido de hidrogênio ativou a via ERK1/2 (mensageiro celular regulador da proliferação celular que pode promover adicionalmente a senescência) responsável por promover apoptose dos fibroblastos.

Em estudos mais recentes, Miwa *et al.* (2022) avaliaram a viabilidade de fibroblastos L929 tratados com concentrações variadas de 50 a 100 μM de H_2O_2 por 2 horas. Os autores também observaram que a atividade das células diminuiu gradualmente de acordo com o aumento da concentração de H_2O_2 e o tempo de exposição. H_2O_2 induziu uma produção aumentada de malondialdeído (MDA) nas células L929, um marcador de estresse oxidativo. O aumento de MDA indica que há maior produção de ROS, peroxidação lipídica da membrana celular e apoptose.

Vieira *et al.* (2020) observaram as alterações na morfologia celular de fibroblastos gengivais humanos expostos ao H_2O_2 . As células perderam a sua morfologia clássica, de células alongadas com extensões filamentosas e passaram a ter morfologia arredondada e achatada. A predominância dessas alterações também esteve intimamente ligada ao tempo de exposição e concentração utilizados, o que condiz com o efeito citotóxico do H_2O_2 nos fibroblastos, que também apresentaram diminuição da viabilidade celular após o tratamento.

Furukawa *et al.* (2015) analisaram os efeitos de um gel clareador com H_2O_2 na citotoxicidade, morfologia celular e expressão gênica de fibroblastos gengivais humanos. Os autores também observaram que o H_2O_2 reduziu significativamente a viabilidade celular, bem como mudou drasticamente a morfologia das células, que perderam a sua morfologia clássica em fuso e tornaram-se arredondadas, além de induzir a expressão de genes associados à cascata de citocina pró-inflamatória TNF-alfa. Os autores também demonstraram que a adição de vitamina E suprimiu os danos provocados pelo estresse oxidativo, exercendo efeito antioxidante e anti-inflamatório.

Outras pesquisas relatam nos seus resultados que o tratamento com compostos antioxidantes pode atenuar os danos provocados pelo H_2O_2 em fibroblastos L929. Chou *et al.* (2023) analisaram o efeito antioxidante e protetor do acemanano metacrilado (um polissacarídeo presente na *Aloe vera*) contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio nos fibroblastos. As células foram pré-tratadas com de H_2O_2 e posteriormente com o acemanana. Foi observada ação antioxidante do polissacarídeo por meio do aumento da viabilidade celular nas células danificadas (tratadas com peróxido) e saudáveis (tratadas somente com acemanana), indicando seu efeito benéfico na recuperação celular.

Outros experimentos conduzidos por Cui *et al.* (2023) (que utilizaram o extrato de *Sargassum thunbergii*), Ryu *et al.* (2023) (que utilizaram extrato da flor de *Koelreuteria henry*) e Santos (2022) (que utilizou o ácido fítico), demonstram em seus

resultados o reestabelecimento do equilíbrio oxidativo em células L929 e atenuação dos danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

2.3 FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação (FBM) é um recurso terapêutico amplamente utilizado na prática clínica para o tratamento da dor, inflamação, lesões e para estímulo e regeneração de tecidos lesionados.

Consiste na aplicação de fontes de luz não ionizantes, como lasers de baixa intensidade (LLL) e diodos emissores de luz (LED) em tecidos biológicos vivos, produzindo diversos efeitos fisiológicos por meio da interação com fotorreceptores celulares chamados cromóforos (Soares, 2024).

As reações biológicas decorrentes da FBM são classificadas como primárias e secundárias. Enquanto as primárias são observadas em poucos segundos ou minutos após a irradiação da luz, derivando da interação entre os fótons e os fotorreceptores, as reações secundárias são os efeitos que ocorrem em resposta às reações primárias, em horas ou dias após o procedimento (Chaves *et al.*, 2014).

A FBM utiliza feixes de luz em comprimentos de onda que incluem a luz vermelha (620–700 nm) ou infravermelho próximo (700–1440 nm) (Ferraresi; Huang; Hamblin, 2016; Hernández-Bule *et al.*, 2024). Nestas faixas espectrais, o principal cromóforo ativado pela FBM é a enzima citocromo C oxidase, presente nas cadeias respiratórias mitocondriais. A absorção da luz influencia as características bioenergéticas das mitocôndrias, resultando na regulação positiva do metabolismo celular pelo aumento de adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Maghfour *et al.*, 2024; Ravera *et al.*, 2021; Karu; Kolyakov, 2005).

A alteração do estado redox celular provocado pela FBM induz a regulação de diversos fatores de transcrição que promovem a síntese proteica e esta, por sua vez, desencadeia aumento na proliferação e migração celular, na oxigenação dos tecidos e promove regulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (Chung *et al.*, 2012).

O LED apresenta sistema condutor composto por camadas (n-p-n). Quando a energia elétrica é depositada, ocorre um processo de recombinação dos elétrons da camada “n” com a camada “p”, liberando energia na forma de luz (Bueno; Cristofolini,

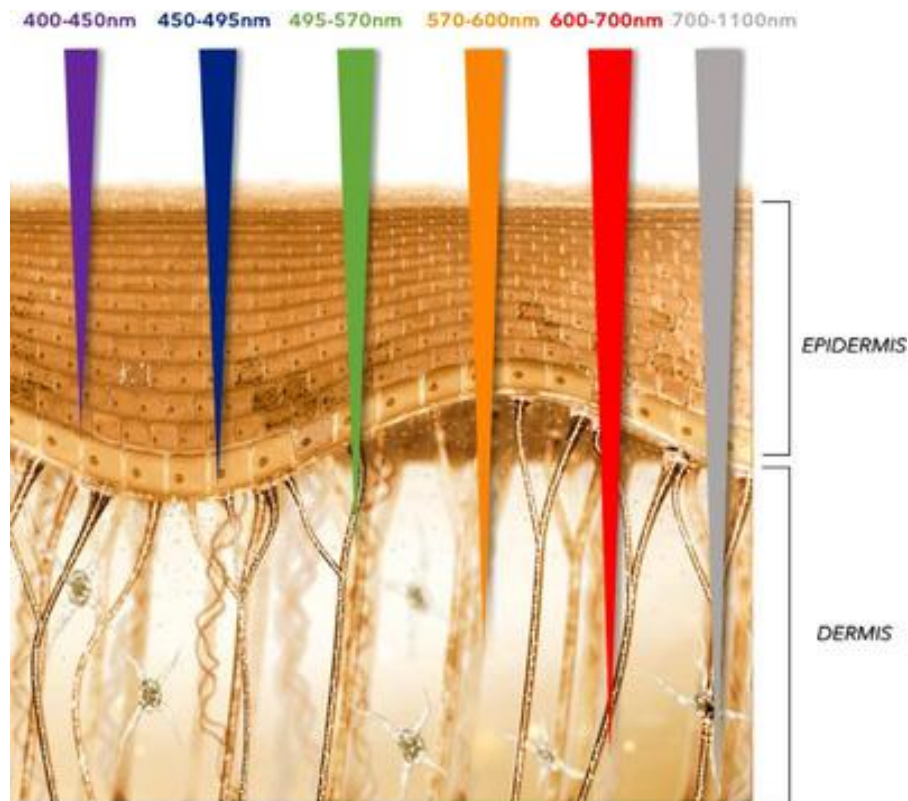
2014). Os dispositivos de LED podem ter diferentes comprimentos de onda, como 400- 470 nm (luz azul), 470-550 nm (luz verde), 630-700 nm (luz vermelha) e 700-1200 nm (infravermelho) (Lima, 2023).

Em comparação ao laser, o LED é uma luz não coerente e não colimada, todavia, o seu custo por mW potência óptica é aproximadamente 100 vezes menor (Zhao *et al.*, 2022). Sendo assim, além de ser considerada uma fonte de luz barata, possibilita cobrir uma maior área de tratamento. O equipamento é mais leve, fácil de operar e menor. Por outro lado, a quantidade de estudos disponíveis sobre o uso de LED como fonte para terapia de fotobiomodulação é consideravelmente menor em comparação às pesquisas realizadas com laser.

Assim como diversas outras terapias, a FBM apresenta relação entre a dosimetria e a resposta fisiológica. Com base na Lei de Arndt-Schultz, a densidade de energia empregada, ou seja, a quantidade de energia entregue aos tecidos (medida em Joules/cm²), pode produzir um efeito benéfico as células ou até mesmo inibir o crescimento celular. Enquanto exposições mais altas podem apresentar efeito inibitório na viabilidade celular, exposições mais baixas podem aumentar a atividade metabólica das células. Todavia estes efeitos também estão ligados ao estado fisiológico das células e número de ciclos realizados (Dos Santos, 2020).

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração para a definição de protocolos de tratamento é o comprimento de onda, uma vez que, na pele, por exemplo, os cromóforos presentes têm coeficientes de dispersão e absorção que são altamente dependentes desse parâmetro. Ao aumentar o comprimento de onda, haverá um aumento correspondente na profundidade de penetração da luz (Ash *et al.*, 2017). Em tecidos biológicos, a janela óptica está entre 600nm e 1300nm. Nessas faixas há uma menor absorção e dispersão da luz pelos principais componentes do tecido (como hemoproteínas, melanina, água, colágeno), o que permite uma penetração mais eficiente e profunda no tecido (Yadav; Gupta, 2017).

Figura 2. Nível de penetração da luz de acordo com seu comprimento de onda.



Fonte: Couturaud *et al.* (2023)

Enquanto o espectro vermelho promove alterações fotoquímicas nos cromóforos no interior das mitocôndrias, aumentando a síntese de ATP, modulando o metabolismo celular e transmitindo efeitos fotobiológicos para outras partes da célula, a radiação infra-vermelha exerce efeitos fotofísicos sobre a membrana celular, o que leva ao equilíbrio iônico celular e a manutenção da polaridade da membrana celular por meio da bomba de sódio/potássio e canais de cálcio, promovendo a modulação de processos celulares (Lago, 2021).

Diferentes estudos demonstram que a FBM apresenta efeito bioestimulador na reparação tecidual, aumentando o metabolismo celular e promovendo a proliferação, sobrevivência e migração de células como os fibroblastos, desencadeando uma maior síntese de proteínas como colágeno e elastina, além de acelerar o reparo tecidual e o fechamento de feridas (Etemadi, 2021; Hernández-Bule *et al.*, 2024; Mokoena *et al.*, 2020; Vinck *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2022).

Wang e Kim (2020) investigaram os efeitos da FBM (660 nm) na cicatrização de feridas infectadas por estafilococos em ratos. Os autores observaram que o grupo que recebeu a irradiação apresentou um melhor processo de cicatrização quando

comparados aos grupos controle e sem irradiação. A FBM induziu um aumento no número de células epiteliais, na formação do tecido de granulação e de vasos sanguíneos, além de induzir uma maior produção de colágeno, promovendo a proliferação celular e potencializando o reparo tecidual.

Além dos efeitos isolados descritos na literatura, a FBM também pode intensificar os efeitos de outras terapias quando aplicadas em um tratamento combinado. Amorim *et al.* (2023) investigaram os efeitos da associação da fotobiomodulação e da membrana amniótica no tratamento de queimaduras em ratos. Os autores observaram que a combinação das terapias foi mais efetiva quando comparada com o uso isolado de cada uma. Uma vez que a membrana amniótica funcionaria como substrato biológico, ela teria sua ação potencializada a partir do microambiente propício à oxigenação, crescimento e modulação celular gerados pela FBM.

Para estudos envolvendo FBM e culturas de células, Ren *et al.* (2016) destacaram que a irradiação do laser nos comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho próximo (660-940 nm) exibem efeitos benéficos na proliferação celular e na modulação da inflamação, sendo a dosagem de energia de 2-10 J/cm² indicada para promover bioestimulação.

Lee *et al.* (2023) trataram fibroblastos com LED utilizando diferentes comprimentos de onda (470, 525, 590, 630 e 850 nm) em uma densidade de energia de 10 J/cm² a fim de comparar os seus efeitos na viabilidade celular. Os autores observaram que os comprimentos de onda de 630 e 850 nm aumentaram a viabilidade das células quando comparadas aos outros grupos, indicando que os efeitos bioestimuladores podem ser esperados quando utilizados os comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

Foi demonstrado por Zhang *et al.* (2003) que a FBM com LED a 628 nm regulou positivamente mais de 100 genes associados ao crescimento celular em fibroblastos. A FBM modulou a expressão de genes relacionados à proliferação celular, genes relacionados à mecanismos antioxidantes, relacionados à apoptose ou resposta ao estresse, ao metabolismo celular, à síntese e reparo do DNA, às interações célula-célula e à componentes celulares como o citoesqueleto. Esses achados também enfatizam os efeitos da FBM no crescimento celular, produção de colágeno, capacidade antiapoptose e efeito antioxidante.

2.4 FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Como dito anteriormente, os efeitos da FBM também estão atrelados ao estado fisiológico das células. Estudos indicam que a resposta da FBM está diretamente relacionada às condições de estresse, estando ausente quando aplicada a um tecido saudável. Ou seja, a melhor aplicação da FBM *in vitro*, aquela em que irá intensificar as funções celulares, ocorre quando as células estiverem estimuladas a alguma condição de estresse (Almeida-Lopes *et al.*, 2001).

Volpato *et al.* (2011) avaliaram a viabilidade celular de fibroblastos cultivados sob estresse nutricional irradiados com laser vermelho, laser infravermelho e led vermelho. O estudo indicou que a fotobiomodulação com diferentes fontes de luz induziu maior proliferação celular nas células cultivadas sob estresse, com melhor resposta no comprimento de onda de 780 nm.

Em um estudo similar, Dos Santos (2020) analisou os efeitos da FBM nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho (660nm e 808nm) em fibroblastos gengivais cultivados sob estresse nutricional, mas com o objetivo de investigar diferenças entre os efeitos da irradiação consecutiva, simultânea e isolada no estresse oxidativo. A autora observou que as irradiações consecutiva e simultânea acarretaram um maior aumento na viabilidade celular. Embora a irradiação consecutiva tenha gerado menor estresse oxidativo, a simultânea acarretou maior produção de ROS. Os achados indicaram um efeito sinérgico e complementar dos dois comprimentos de onda no interior das células, dito que os espectros vermelho e infravermelho provocam efeitos celulares distintos.

Zabeu (2022) estudou o efeito fotoprotetor do laser de baixa intensidade em células SH-SY5Y induzidas ao estresse oxidativo com H₂O₂. Foi demonstrado que a fotobiomodulação apresentou efeito fotoprotetor diante do estresse oxidativo quando realizada previamente ao tratamento com H₂O₂, aumentando a atividade mitocondrial 24 horas após o tratamento.

Zuo *et al.* (2022) irradiaram osteoblastos tratados com H₂O₂, observando que o grupo tratado com a fotobiomodulação apresentou melhora significativa na atividade celular em comparação ao grupo tratado somente com H₂O₂, indicando que a FBM pode promover a sobrevivência celular, inibir os danos gerados pelo estresse oxidativo por meio da diminuição da expressão de ROS e conseqüentemente inibir a apoptose induzida pelo H₂O₂.

Nasuk (2023) investigou os efeitos da FBM no estresse oxidativo em células endoteliais de veia umbilical humana submetidas à hipoxia. O autor constatou que o pré-tratamento com laser em 660nm e 1,5J/cm² promoveu aumento da viabilidade celular, aumentou a expressão de RNAs de enzimas antioxidantes como CAT e SOD, diminuiu a expressão de marcadores de estresse celular e de ROS, o que indica que a FBM protegeu as células contra os danos celulares.

Com o objetivo de investigar os efeitos da FBM em fibroblastos cultivados com alto teor de glicose (diabéticos), Chen *et al.* (2020) demonstraram que o laser de 635 nm, além de aumentar a proliferação celular, inibiu a apoptose pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial, e aumentou a capacidade antioxidante total das células pelo aumento de SOD e redução de ROS. A exposição à luz vermelha também diminuiu a secreção de fatores inflamatórios, sendo os melhores efeitos encontrados na exposição de 3J/cm².

Uma vez que a fotobiomodulação (FBM) é um recurso terapêutico capaz de modular processos oxidativos e inflamatórios, a FBM surge como uma abordagem promissora para a redução de danos celulares decorrentes do estresse oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho busca elucidar o possível efeito fotoprotetor *in vitro* da fotobiomodulação pela associação dos LEDs 660 e 850 nm em células L929 diante do tratamento com H₂O₂ como modelo de estresse oxidativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar alterações na atividade metabólica celular frente à exposição da irradiação com LED ou do H₂O₂;
- Analisar alterações morfológicas nas células submetidas aos tratamentos;
- Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio frente aos tratamentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR L929

A linhagem celular L929 é uma linhagem contínua de fibroblastos de camundongo que tem sido modelo em testes de citotoxicidade/viabilidade celular segundo a ISSO 10993. A mesma foi adquirida do Laboratório de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil. Para o cultivo da linhagem celular L929, as células foram mantidas em garrafas de cultura 75cm² com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – Gibco) suplementado com 10% de SFB (Gibco® – Life Technologies) e 1% antibiótico/antimicótico (Gibco® – Life Technologies) e incubadas em estufa a 37°C e pressão de 5% de CO₂ (Forma Scientific CO₂ Water Jacketed incubator – Instrucom Ltda). O crescimento celular foi acompanhado por meio de observações diárias em microscópio invertido Olympus CK40 e o meio trocado a cada dois dias.

As células foram desprendidas das garrafas de cultura por tripsinização, foram coletadas e adicionadas em tubo de 15 mL contendo 6 mL de meio de cultura que seguiu para centrifugação a 5.000 RPM por 5 minutos. O *pellet* de células da centrifugação foi suspenso em 1 mL de meio de cultura e foram retirados 25 µL da solução para a quantificação do número de células no equipamento Tali (ThermoFisher) e, assim, definir o número de células a ser adicionado por poço da placa de cultura. As células foram distribuídas em placas de 24 poços, sendo utilizadas 1x10⁴ células/mL em cada poço. Após plaqueadas, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas.

4.2 INDUÇÃO AO ESTRESSE OXIDATIVO

As células L929 foram incubadas com Peróxido de Hidrogênio 35% (Molekular Química, Rio de Janeiro, Brasil) diluído em meio de cultura, na concentração padronizada por Rossato *et al.* (2025) de 200 µM de H₂O₂.

Conforme o resultado obtido no ensaio piloto para avaliação da atividade mitocondrial em diferentes tempos de incubação com o H₂O₂ (Fig. 5), as células L929 permaneceram incubadas com o agente oxidante pelo período de 3 horas. Após esse

período, foi feita a troca do meio de cultura e as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram definidos 4 grupos experimentais:

1. Controle (Sem tratamento);
2. LED (Irradiação simultânea com LED a 660nm e 850nm);
3. H₂O₂ (Incubação com 200 µM de H₂O₂ em meio de cultura por 3 horas);
4. LED + H₂O₂ (Pré irradiação simultânea com LED 660 e 850 nm, seguida da incubação com 200 µM de H₂O₂ em meio de cultura por 3 horas).

Os grupos foram plaqueados em placas separadas e de forma intercalada por conta da evaporação do H₂O₂.

Após os respectivos tratamentos, as células permaneceram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas e, posteriormente, as análises foram realizadas.

4.4 IRRADIAÇÃO

Foi utilizado um dispositivo de LED Sportlux Ultra (fabricante Cosmedical® Every Eletroeletrônica Imp. Exp. Ltda, Mauá, São Paulo, Brasil) de 660nm/850nm (em formato de manta), com potência total de 672 mW (8 mW de potência por LED X 84 LEDs).

O dispositivo consiste em 84 LEDs, cada LED individual tem 8 mW de potência, emitindo em 660±20 nm (42 LEDs) e 850±20 nm (42 LEDs), e cobrindo uma área (A) de 120 cm² com LEDs intercalados em cada comprimento de onda. O tratamento por irradiação com os dois comprimentos de onda é simultâneo, não havendo possibilidade de irradiação somente com um deles (vermelho ou infravermelho).

A densidade de potência e fluência foram calculados de acordo com a fórmula: densidade de potência - (8 mW de potência por LED X 84 LEDs) / área de irradiação = 5,6 mW/cm²; fluência - (5,06 mW/cm² X tempo) = 5,6 X t(s) = 5,6 X 600 = 3,4 J/cm² (Lima; Pacheco-Soares, Silva; 2022).

Figura 3. Dispositivo para irradiação LED Sportlux Ultra (Cosmedical®)



Fonte: Sportlux (2025).

A irradiação das células ocorreu 24 horas após seu plaqueamento, em ambiente escuro a fim de evitar a interferência de outras fontes luminosas. Ao final da irradiação, cada placa levada para estufa a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas.

Figura 4. Irradiação da placa de cultura celular



Fonte: Autores

4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Para realização do ensaio de atividade mitocondrial, foi utilizado o reagente Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA). O Alamar Blue é composto por Resazurina, um ativo permeável às células de coloração azulada. Ao entrar nas células vivas, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto de coloração avermelhada. Ou seja, quando adicionado às células, o reagente de atividade mitocondrial Alamar Blue é modificado pelo ambiente redutor de células vivas e há alteração na coloração. Essa mudança de cor pode ser detectada usando absorvância (detectada a 570 e 600 nm).

Para realização do ensaio, o Alamar Blue foi diluído em meio de cultura, sendo 90% meio de cultura e 10% Alamar Blue. As placas permaneceram com o reagente por 2 horas em estufa longe da luz e a absorvância foi lida usando um espectrofotômetro (SpectraCount, modelo BS10000, Packard, EUA) a 570 nm.

4.6 MORFOLOGIA CELULAR

Após as 24 horas de incubação em estufa a 37° C, em atmosfera de 5% de CO₂, as placas foram levadas ao microscópio invertido (Model DM IL, Leica) para observação de possíveis alterações morfológicas frente aos tratamentos apresentados, sendo as células analisadas e fotografadas utilizando-se câmera digital (Model DFC 300FX, Leica).

4.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

4.7.1 NÚCLEO E MITOCÔNDRIAS CELULARES

Para a marcação do núcleo celular foi utilizado o marcador Hoechst (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA). O Hoechst é uma coloração de DNA permeável a células que se liga preferencialmente às regiões de adenina-timina (A-T) do DNA. É excitada por luz ultravioleta e emite fluorescência azul a 460-490 nm, sendo utilizado para coloração específica de núcleos. O Hoechst foi diluído em meio de cultura na proporção de 3:10.000. Em seguida, a placa de cultivo foi incubada por 10 minutos em estufa longe da luz. Após o período, os poços foram

lavados com PBS para retirar o excesso de corante. Para a realização das fotografias foi utilizado o microscópio confocal LSM 700 Zeiss.

Para a marcação das mitocôndrias foi utilizado o Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (TMRM) - (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA). O TMRM é um corante permeável às células que se acumula em mitocôndrias ativas com potenciais de membrana intactos. Quando as células estão saudáveis e têm mitocôndrias funcionais, o sinal é brilhante. O TMRM foi diluído em meio de cultura na proporção de 1:1.000. Em seguida, a placa de cultivo foi incubada por 30 minutos em estufa longe da luz. Após o período, os poços foram lavados com PBS para retirada do excesso de corante. Para a obtenção das fotomicrografias foi utilizado o microscópio confocal LSM 700 Zeiss.

4.7.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Para medir o estresse oxidativo nas células foi utilizado o CellROX™ Orange - (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA). O CellROX™ é um corante permeável à célula que exibe fluorescência laranja brilhante após oxidação por espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo utilizada para medir o estresse oxidativo em células vivas. As células foram incubadas com o CellROX™ (5uL diluído em meio DMEM) durante 30 minutos em estufa longe da luz. Após o período, os poços foram lavados com PBS para retirada do excesso de corante. Para a obtenção das fotomicrografias foi utilizado o microscópio confocal LSM 700 Zeiss.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização dos gráficos, utilizou-se o programa GraphPad Prism. As médias dos dados foram comparadas pelo teste ANOVA seguido por Tukey, estabelecendo o nível de significância de $p < 0,05$.

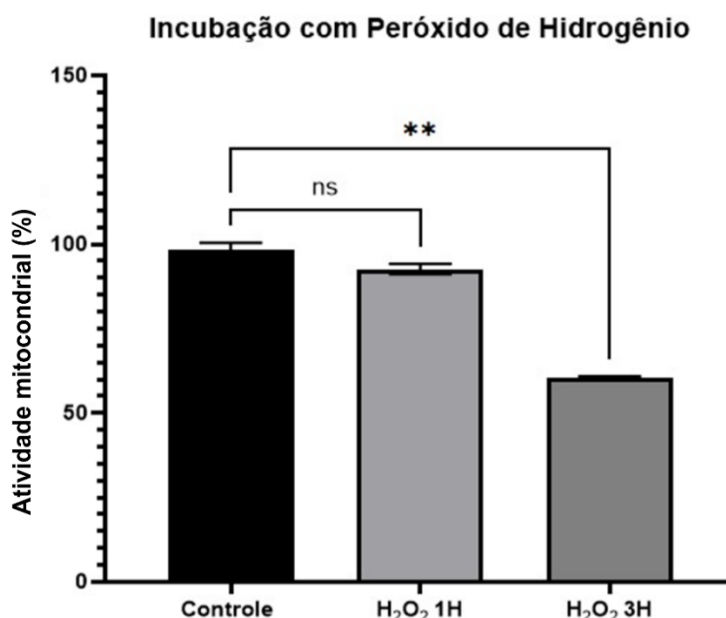
5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL – H₂O₂

Sabendo-se da atividade citotóxica do H₂O₂, o primeiro experimento deste estudo teve como objetivo estabelecer o tempo de exposição ao H₂O₂, de forma que induzisse o estresse oxidativo nas células L929, mas sem acarretar a morte celular extensa, e que, portanto, pudesse ser posteriormente utilizado para avaliação do efeito protetor do LED. Dessa forma, foi realizado o ensaio de atividade mitocondrial com o reagente Alamar Blue, sendo as células L929 incubadas com 200 µM de H₂O₂ por 1 e 3 horas para avaliação da citotoxicidade.

Os resultados do ensaio de atividade mitocondrial em resposta ao tratamento com H₂O₂ podem ser visualizados na Figura 5.

Figura 5. Porcentagem de atividade mitocondrial das células L929 após diferentes tempos de incubação com H₂O₂. Grupo H₂O₂ 1H incubado com 200 µM de H₂O₂ de por 1 hora e grupo H₂O₂ 3H incubado com 200 µM de H₂O₂ por 3 horas. *p<0,05



Fonte: Autores

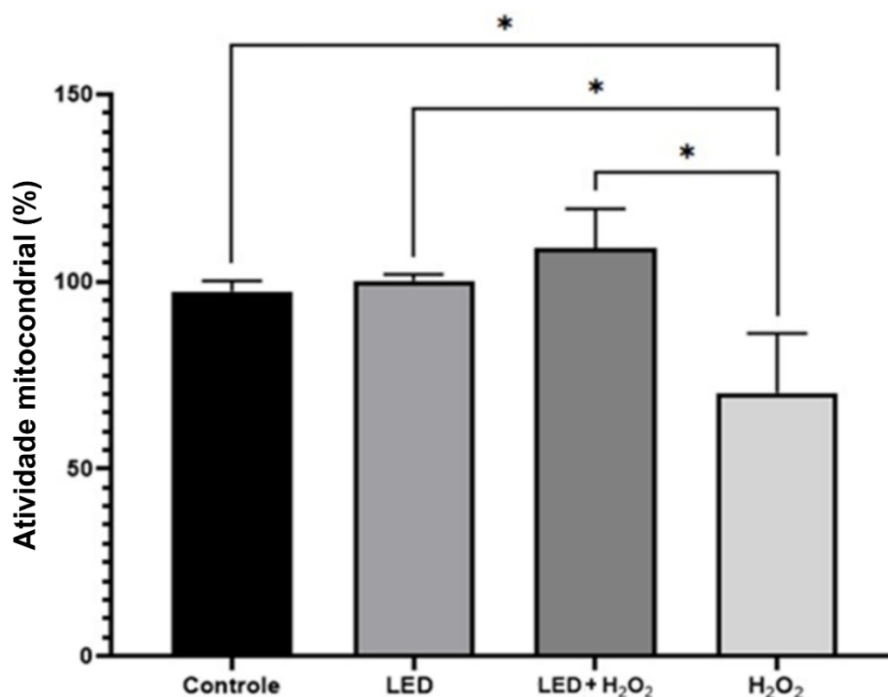
Conforme demonstrado na Figura 5, observa-se que após 1 hora de incubação com o H₂O₂, as células L929 apresentaram pouca redução na atividade mitocondrial, estando próximas ao nível do grupo controle. Entretanto, para o tempo de incubação

de 3 horas, foi possível observar uma diminuição significativa na atividade mitocondrial quando comparado ao controle ($p < 0,05$), ainda apresentando células com atividade metabólica. Diante disso, o tempo de incubação de 3 horas foi definido para realização dos experimentos posteriores.

5.2 ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL – LED E H₂O₂

Os resultados do ensaio de atividade mitocondrial podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 6. Porcentagem de atividade mitocondrial das células L929 após os tratamentos com LED e/ou H₂O₂. Grupo controle (sem tratamento), grupo LED irradiado simultaneamente em 660 e 850 nm, grupo LED + H₂O₂ pré-irradiado simultaneamente em 660 e 850 nm e incubado com 200 μ M de H₂O₂ por 3 horas e grupo H₂O₂ incubado com 200 μ M de H₂O₂ por 3 horas. * $p = 0,001$



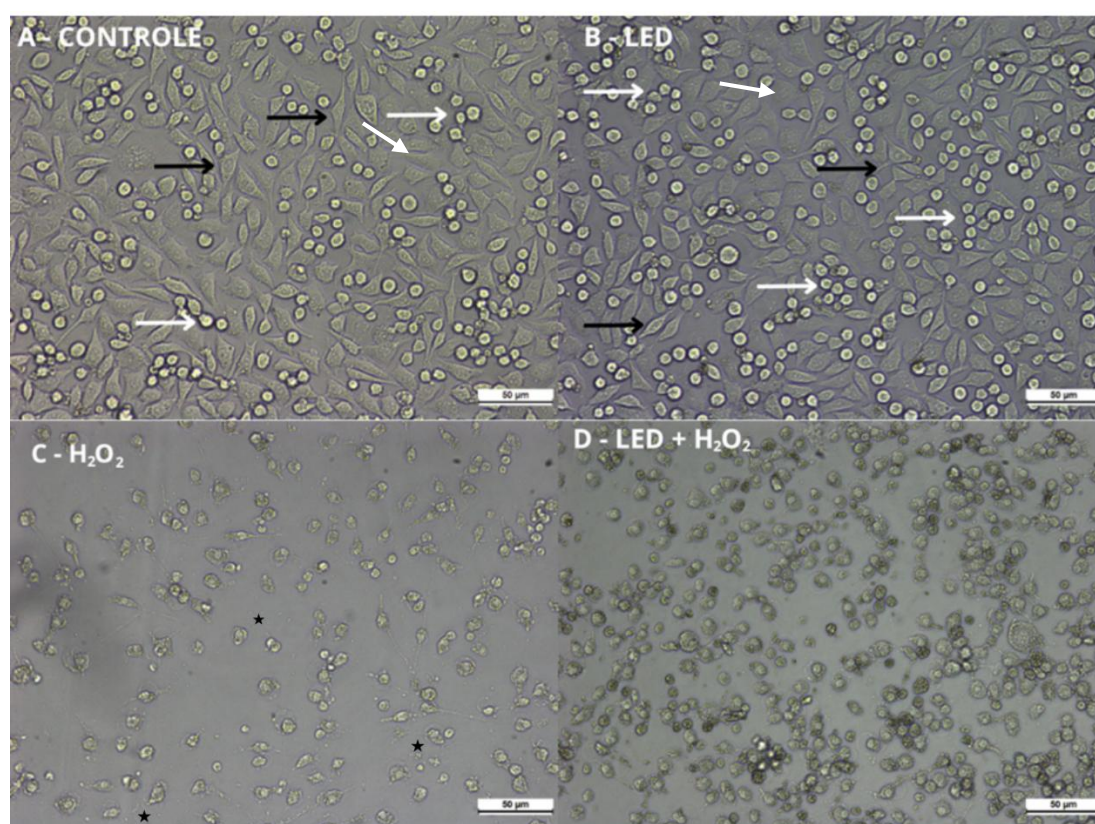
Fonte: Autores

Os resultados demonstram que, não houve diferença significativa quando os grupos LED e LED+H₂O₂, foram comparados com o grupo Controle (sem tratamento), ocorrendo diferença estatística somente quando comparado ao grupo H₂O₂ ($p = 0,001$). Na comparação entre os grupos LED e LED+H₂O₂ com o grupo H₂O₂, ambos apresentaram diferença estatística ($p = 0,001$).

5.3 MORFOLOGIA CELULAR

Na Figura 7 são mostradas as imagens dos fibroblastos L929, sendo: A – Controle; B – LED; C – H₂O₂; D – LED+H₂O₂, sendo possível verificar que ocorreram modificações na morfologia das células frente aos diferentes tratamentos.

Figura 7. Visualização das células por microscopia invertida. O grupo controle (A) e o grupo LED (B) apresentaram células com formato fusiforme (setas pretas) e células arredondadas (setas brancas). O grupo C apresenta restos celulares (estrelas pretas) ao fundo da fotomicrografia.



Fonte: Autores

Em relação ao grupo controle (A), pode-se observar que a grande maioria das células apresentou morfologia clássica, com formato fusiforme (seta preta) e citoplasma abundante com prolongamentos. Em algumas células é possível visualizar os núcleos, que estão íntegros, grandes e com morfologia arredondada. Algumas células menores e arredondadas (seta branca) podem ser visualizadas, o que provavelmente represente células em divisão que estão desprendidas do fundo do poço da placa de cultura.

Em relação ao grupo Led (B), pode-se observar que as células também apresentaram morfologia clássica, com formato fusiforme e citoplasma abundante com prolongamentos (seta preta). Os núcleos estão íntegros e com morfologia arredondada. Uma quantidade maior de células desprendidas pode ser visualizada (seta branca), o que novamente, provavelmente, represente células em divisão que estão desprendidas do fundo do poço da placa de cultura. É possível observar que a FBM com o LED não apresentou efeito citotóxico para as células, uma vez que a morfologia celular e a população de células se mantiveram preservadas.

Diferentemente, o grupo que foi induzido ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (C) apresentou uma evidente alteração na morfologia celular. As células L929 perderam completamente a sua morfologia clássica, adquirindo morfologia irregular, arredondada e sem prolongamentos. É possível observar que houve uma diminuição significativa na população celular, principalmente em comparação com os grupos Controle e LED. Ainda, foi observada presença de restos celulares (estrelas pretas), provavelmente das células que tiveram as suas membranas rompidas após o tratamento. Tais observações indicam que o peróxido de hidrogênio apresentou efeito citotóxico para as células, que sofreram morte celular após o tratamento.

Em relação ao grupo LED+H₂O₂(D), quando em comparação ao grupo controle, também é possível observar que as células perderam a sua morfologia clássica compatível à resposta frente ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. Todavia, é possível observar que, em comparação grupo H₂O₂, a população celular se manteve significativamente maior, o que indica que o LED exerceu efeito protetor às células, aliviando os danos produzidos pelo estresse oxidativo e induzindo a recuperação celular.

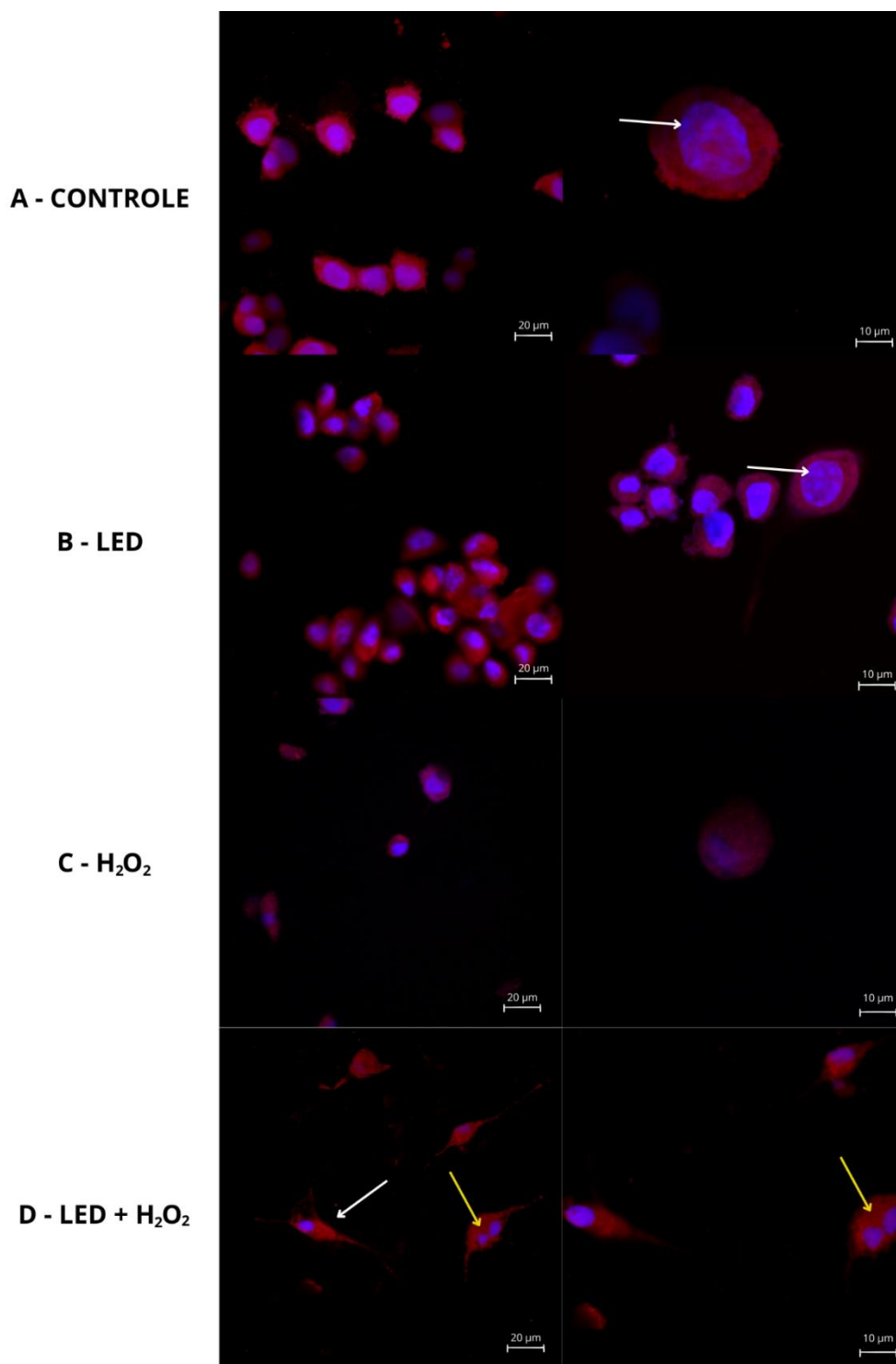
5.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

5.4.1 NÚCLEO E MITOCÔNDRIA

Na Figura 8 são mostradas as imagens dos fibroblastos L929 com marcação para visualização dos núcleos e mitocôndrias, sendo:

A – Controle; B – LED; C – H₂O₂; D-LED+H₂O₂.

Figura 8. Avaliação das mitocôndrias e núcleo celular por meio da marcação de fluorescência. Algumas células do grupo controle (A), grupo LED (B) e grupo LED+H₂O₂(D) apresentaram pontos de condensação da cromatina (setas brancas). O grupo LED+H₂O₂(D) apresentou células no processo de divisão celular (seta amarela).



Fonte: Autores

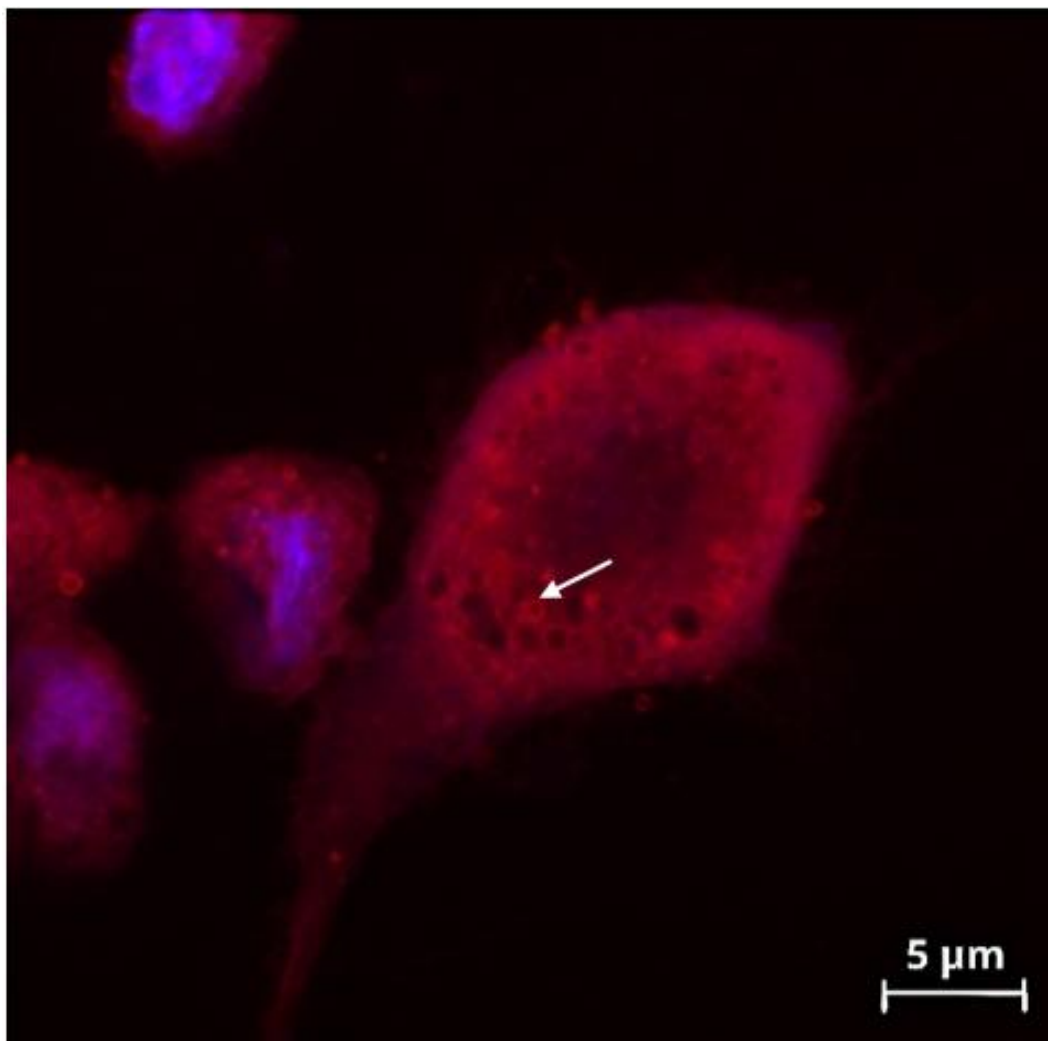
Nas fotomicrografias do grupo controle pode-se observar que as células L929 apresentaram núcleos íntegros, arredondados e uniformes. Também é possível observar pontos de condensação da cromatina (seta branca). As mitocôndrias apresentaram distribuição normal ao redor do núcleo e por todo o citoplasma, indicando uma distribuição homogênea do corante e alto potencial de membrana mitocondrial, relevando intensa atividade mitocondrial. Essas observações são esperadas, uma vez que as células deste grupo não estiveram sob nenhum tipo de tratamento, apresentando características típicas e homogeneidade celular.

Nas fotomicrografias do grupo irradiado pode-se observar que as células apresentaram diferenças na morfologia dos núcleos, em que alguns se apresentaram irregulares e com deslocamento no citoplasma quando comparados ao controle. Também foi possível observar pontos de condensação da cromatina (seta branca). Por outro lado, pode-se visualizar um alto potencial de membrana mitocondrial, distribuição normal das mitocôndrias por todo o citoplasma, além de um maior número de células quando comparado ao grupo controle. Um achado interessante no grupo irradiado foi demonstrado na Figura 9, em que é possível observar o desenvolvimento de mitocôndrias gigantes de aspecto globular (seta).

Nas fotomicrografias do grupo induzido ao estresse oxidativo com H_2O_2 , as células apresentaram comprometimento na morfologia celular e alterações na morfologia do núcleo, como redução de tamanho e perda de formato. A população celular também se apresentou reduzida e o potencial de membrana mitocondrial foi reduzido, relevando baixa atividade mitocondrial, o que indica citotoxicidade e dano celular induzido pelo estresse oxidativo.

Já nas fotomicrografias do grupo que recebeu o pré-tratamento com LED antes da indução ao estresse oxidativo com H_2O_2 , pode-se observar que as células estão mais espalhadas, com grande diferença no potencial de membrana mitocondrial, que está elevado por todo o citoplasma em comparação ao grupo tratado somente com H_2O_2 e semelhante ao grupo controle. É possível observar que alguns núcleos tendem a apresentar morfologia mais regular e pontos de condensação da cromatina (seta branca) quando comparados ao grupo de estresse oxidativo. Também é possível observar o processo de divisão celular (seta amarela). Esses achados indicam que o LED pode exercer efeito protetor para as células, induzindo a recuperação celular.

Figura 9. Visualização de mitocôndrias gigantes por meio da marcação de fluorescência no grupo LED (B).



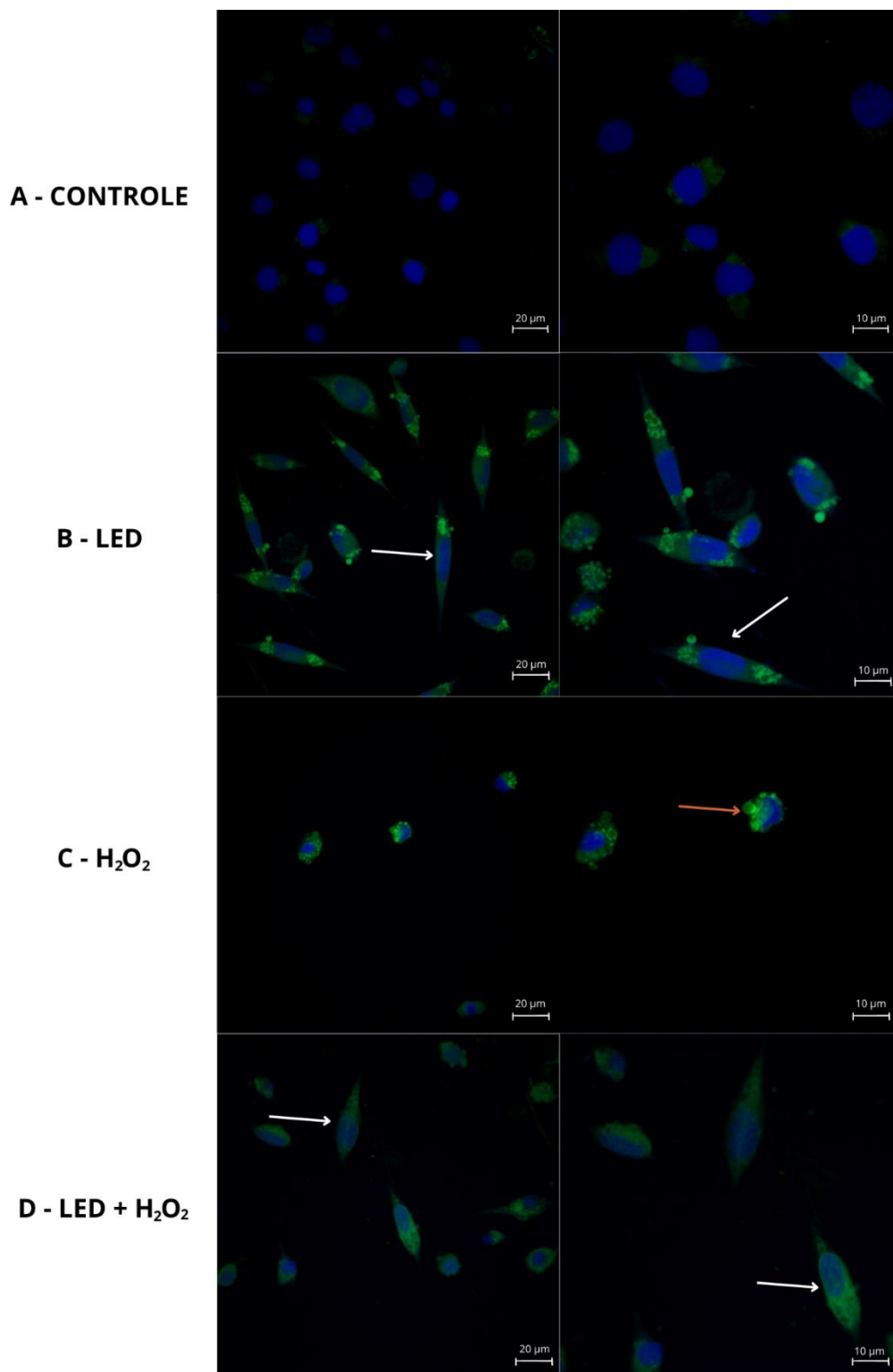
Fonte: Autores

5.4.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Na Figura 10 são mostradas as imagens dos fibroblastos L929 marcados com o Cellrox para a detecção de ROS, sendo:

A – Controle; B – LED; C – H₂O₂; D-LED+H₂O₂.

Figura 10. Avaliação de ROS por meio da marcação de fluorescência. Algumas células do grupo LED (B) e grupo LED+H₂O₂ (D) apresentaram morfologia espalhada e alongada (setas brancas). O grupo H₂O₂ (C) apresentou alta emissão de fluorescência (seta laranja).



Fonte: Autores

Nas fotomicrografias do grupo controle pode-se observar que as células L929 apresentaram a fluorescência verde (espécies reativas de oxigênio) de forma pontual em algumas células. A marcação com Hoechst 33342 demonstrou que os núcleos celulares estavam íntegros e morfológicamente preservados.

No grupo tratado com LED (Fig. 10B), há uma maior intensidade de fluorescência por todo o citoplasma celular, indicando maior produção de ROS. Ainda, é possível observar alterações na morfologia celular após o tratamento, uma vez que as células se apresentaram mais espalhadas e alongadas (setas brancas) em comparação ao grupo controle (Fig. 10B).

Em relação ao grupo tratado com H_2O_2 , é possível observar uma alta intensidade de fluorescência, principalmente ao redor dos núcleos (seta laranja), indicando uma alta produção de ROS (Fig. 10C). Ainda, as células se apresentaram arredondadas e com sinais de fragmentação devido dano celular decorrente do estresse oxidativo.

Nas fotomicrografias do grupo que recebeu o pré-tratamento com LED antes da indução ao estresse oxidativo, os níveis de fluorescência estão menores quando comparados ao grupo H_2O_2 e ao grupo LED isoladamente, sendo possível observar que as células recuperaram parcialmente sua morfologia, estando espalhadas e alongadas (setas brancas) (Fig. 10D), sugerindo efeito protetor do pré-tratamento com LED contra o estresse oxidativo.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, numerosos estudos têm buscado investigar terapias que exibem um papel protetor contra os danos do estresse oxidativo (Baeck; Lee, 2016; Chen *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2018; Michalak, 2022; Ryu *et al.*, 2023; Dos Santos, 2022). Paralelamente, diversos estudos têm comprovado a eficiência da FBM como uma ferramenta de biomodulação em sistemas biológicos (Etemadi, 2021; Hernández-Bule *et al.*, 2024; Karu; Kolyakov, 2005; Maghfour *et al.*, 2024; Mokoena *et al.*, 2020; Vinck *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2022). No presente estudo, buscou-se elucidar se o pré-tratamento com LED exerceria efeito citoprotetor em fibroblastos L929 quando estes são submetidos ao estresse oxidativo pela exposição ao H₂O₂. Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram que houve biomodulação das células L929 frente à FBM, onde ocorreu um estímulo dos mecanismos de defesa que regulam a homeostase celular diante do estresse oxidativo.

O ensaio de atividade mitocondrial possibilitou inferir que a exposição ao H₂O₂ induz citotoxicidade no modelo celular L929, sendo este efeito dependente do tempo de exposição ao agente oxidante, visto que a exposição por um período maior (3 horas) induziu maior redução da atividade metabólica das células quando comparado com um menor tempo de incubação (1 hora) (Fig. 5). Este resultado está de acordo com o de Lang *et al.* (2024), que avaliaram os efeitos do estresse oxidativo com H₂O₂ em fibroblastos L929, relatando que a exposição a 264,4 µM de H₂O₂ por 2 horas resultou em uma redução de 50% da viabilidade celular, e o aumento da concentração e do tempo de exposição diminuiu gradualmente a atividade metabólica dos fibroblastos.

Em outro estudo, Cui *et al.* (2023) trataram células L929 com diferentes concentrações de H₂O₂ (0-500µM) pelo período de 3 horas, a fim de avaliar a viabilidade celular diante da indução ao estresse oxidativo. A aplicação do H₂O₂ reduziu a viabilidade das células de maneira dependente da concentração, sendo que 200µM de H₂O₂ diminuiu a atividade mitocondrial das células L929 em aproximadamente 50%, o que também está de acordo com o resultado que obtivemos em nosso experimento. Dessa maneira, quando comparamos o resultado de nosso estudo com outros achados na literatura, pode-se concluir que os efeitos deletérios do H₂O₂ em linhagens celulares são dependentes do tempo de exposição, bem como da dosagem utilizada durante o tratamento (Miwa *et al.*, 2022; Vieira *et al.*, 2020).

Dado que as mitocôndrias são o principal local de produção de ROS e o seu excesso pode danificá-las, a disfunção mitocondrial está intimamente ligada ao estresse oxidativo (Rossato *et al.*, 2024). A diminuição na capacidade respiratória da mitocôndria, bem como alterações em sua morfologia estão associados não só ao envelhecimento, mas também à outras condições patológicas associadas a ele, como o câncer, doenças neurodegenerativas, doenças metabólicas, dentre outras (Miwa *et al.*, 2022).

Sendo assim, após selecionar o tempo de incubação com o H₂O₂, o experimento seguinte consistiu em uma avaliação intergrupos do metabolismo celular, com o objetivo de comparar os efeitos dos grupos controle, H₂O₂, LED e LED+H₂O₂ a fim de verificar se a FBM exerceria efeitos bioestimulatórios e/ou protetores às células diante do estresse oxidativo. Como mostrado na Figura 6, o efeito do LED foi avaliado tanto de maneira isolada quanto como pré-tratamento nas células induzidas ao estresse oxidativo.

Em relação a aplicação isolada da FBM, os resultados demonstraram que a FBM sozinha não alterou significativamente o metabolismo celular, dado que os níveis de células ativas do grupo irradiado e controle se mantiveram próximos. Já em relação ao grupo LED+H₂O₂, os resultados do ensaio de metabolismo celular demonstraram que o pré-tratamento com a luz vermelha e infravermelha protegeu as células dos danos ocasionados pelo H₂O₂, uma vez que houve aumento significativo na atividade mitocondrial quando em comparação ao grupo H₂O₂, indicando que a FBM pode aumentar a sobrevivência celular em um ambiente de estresse. Vale ressaltar ainda que, apesar de não haver significância estatística, o grupo LED+H₂O₂ apresentou viabilidade celular superior ao grupo controle (Fig. 6).

Segundo Karu (1989), a magnitude dos efeitos bioestimuladores da FBM são também dependentes do estado fisiológico das células. Os efeitos são evidenciados em células em déficit nutricional, desordem funcional ou injúria, pois essas condições funcionam como um gatilho para a ação da luz na tentativa de melhorar e normalizar a atividade celular. Em um tecido saudável não há estímulos para que a ação do laser seja iniciada, por isso o efeito será fraco ou ainda nenhum efeito terapêutico será observado. Isso explica o porquê do efeito da bioestimulação nem sempre ser possível, como ocorreu quando a FBM foi aplicada de maneira isolada nas células L929 (E Silva, 2014).

Laffitte *et al.* (2024), demonstrou que a FBM com laser de diodo em comprimentos de onda de 660 nm e 790 nm afetou positivamente a viabilidade de células pré-osteoblásticas cultivadas sob déficit nutricional, com efeitos mais positivos quando em comparação com a células cultivadas em condições nutricionais normais.

Aplicando os mesmos parâmetros utilizados no presente estudo, Lima, Pacheco-Soares e Silva (2022) irradiaram células musculares C2C12 com LED a 660 e 850 nm, simultaneamente, com fluência de 3,4 J/cm², demonstrando que o sinergismo entre os dois comprimentos de onda induz a proliferação celular. As células C2C12 foram divididas em dois grupos: controle (não irradiado) e grupo de tratamento (irradiado). O tratamento com LED promoveu aumento na atividade mitocondrial das células em 32% quando em comparação com o grupo controle. Os autores também observaram que a fotobiomodulação nas células promoveu uma maior organização do citoesqueleto, o que pode ajudar na força de contração das células musculares.

Assim como demonstrado por Lima, Pacheco-Soares e Silva (2022), os resultados do ensaio de atividade mitocondrial do presente estudo indicaram que a exposição combinada a diferentes comprimentos de onda pode levar a respostas aditivas ou sinérgicas.

Enquanto os ensaios de atividade mitocondrial analisam o estado fisiológico das células, por meio de fotomicrografias é possível verificar a ocorrência de modificações na morfologia celular frente aos diferentes tratamentos. Como demonstrado na Figura 7, a visualização das células do grupo H₂O₂ indicou que o estresse oxidativo reduziu a densidade celular e induziu perda morfológica quando em comparação às células do grupo controle e LED, confirmando os resultados do ensaio de atividade mitocondrial em que o H₂O₂ apresentou efeito citotóxico para as células e ativou vias de morte celular (apoptose e/ou necrose), visto que com o excesso de ROS a célula perde a capacidade de defesa e de reparo.

No presente estudo, com a análise da fotomicrografia do grupo LED+H₂O₂, onde as células foram submetidas ao pré-tratamento com LED previamente à indução ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, em comparação ao grupo H₂O₂, observa-se que a população celular se apresentou significativamente maior (Fig. 7), o que condiz com o aumento da atividade mitocondrial apresentado pelo Alamar Blue. Esses resultados podem elucidar melhor a nossa hipótese de que a fotobiomodulação exerce efeito protetivo e de manutenção da homeostase celular nas células L929.

Nessas condições, a ação citoprotetora da FBM se dá pela ativação do sistema antioxidante celular. A FBM suprime a superprodução de ROS, visto que a energia entregue às células aumenta o potencial de membrana mitocondrial e a geração de ROS pela mitocôndria é diminuída, aliviando o estresse oxidativo. Estudos demonstram que a FBM ativa diferentes mecanismos de defesa contra a produção H_2O_2 , como o aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase (Dos Santos *et al.*, 2017; Heo *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2016).

A microscopia de fluorescência realizada com os marcadores TMRM e Hoechst coram as mitocôndrias e o núcleo em células vivas. É possível observar na Figura 8 que o H_2O_2 ocasionou mudanças na morfologia dos núcleos celulares, que se apresentaram menores e irregulares. Segundo estudos, a difusão direta de H_2O_2 nas células pode contribuir para o alto ROS intracelular, que tem sido associado a alterações na organização da cromatina e na transcrição genética (Juan *et al.*, 2021; Lennicke *et al.*, 2015; Ransy *et al.*, 2020). O H_2O_2 que entra nas células pode ser metabolizado em $OH\cdot$, e sabe-se que este radical induz lesões ao DNA. ROS extracelulares promovem alterações na morfometria nuclear, como o tamanho e/ou forma do núcleo, o que está presente na senescência e em distúrbios de diferenciação, incluindo câncer e neurodegeneração. Isso ocorre em vista que estresse oxidativo afeta a função da lâmina A por oxidação, uma estrutura da membrana nuclear interna fundamental na manutenção da forma nuclear. Defeitos nas lâminas causam alterações na forma nuclear, levam à senescência e afetam a sinalização e o reparo de danos ao DNA (Barascu *et al.*, 2012; Chittiboyina; Bai; Lelièvre, 2018).

Em relação às mitocôndrias, pode-se observar que, enquanto as células do grupo controle exibem alta emissão de fluorescência de TMRM, como esperado, as células do grupo H_2O_2 mostraram baixa emissão de fluorescência, indicando pouca atividade mitocondrial como consequência da alta produção de ROS (Fig. 8).

O potencial de membrana mitocondrial é um sinal de saúde celular, pois fornece o gradiente de carga necessário para a produção de ATP e regula a produção de ROS. A perda do potencial de membrana mitocondrial é um sinal de estresse e pode resultar na liberação de fatores apoptóticos que levam à morte celular (Barascu *et al.*, 2012; Chittiboyina; Bai; Lelièvre, 2018). Segundo Miwa *et al.* (2022), as mitocôndrias em fibroblastos podem ser coradas com o TMRM, que se acumula nas mitocôndrias de

forma dependente do potencial de membrana. Em fibroblastos senescentes, seu potencial de membrana é menor (conforme indicado pela coloração fraca e irregular de TMRM), sendo a disfunção mitocondrial e a produção de ROS associada encontradas na senescência induzida por estresse oxidativo.

Estudos indicam que a incubação com H₂O₂ induz fragmentação da rede mitocondrial e afeta diretamente o potencial de membrana mitocondrial (MMP), fazendo com que as células apresentem menor capacidade de reserva para respiração. A morte celular induzida pelo estresse oxidativo nas células pode ocorrer via apoptose, bem como necrose, estando associada ao colapso de MMP (Fan; Hussien; Brooks, 2010; Park, 2013).

Por outro lado, o tratamento com a FBM, tanto no grupo LED quanto no grupo LED+H₂O₂, induziu uma maior emissão de fluorescência de TMRM (Fig. 8), indicando que a irradiação promoveu maior capacidade energética da membrana mitocondrial e potencialmente maior síntese de ATP. A morfologia das células do grupo LED+H₂O₂ também foi alterada, pois elas estiveram espalhadas, sendo possível observar o processo de divisão celular (seta amarela), condizente com o estado metabólico da célula (Fig. 8).

Um achado interessante foi demonstrado no grupo LED, em que foi possível observar o desenvolvimento de mitocôndrias gigantes (Fig. 9, seta). Segundo Manteifel, Bakeeva e Karu (1997), o surgimento dessas mitocôndrias ocorre possivelmente pela fusão de várias mitocôndrias pequenas. As mitocôndrias gigantes fornecem maiores níveis de respiração e renovação energética em células irradiadas, o que condiz com o fato de a FBM induzir aumento do ATP celular.

A marcação com o corante Cellrox foi utilizada para a detecção de ROS. Na figura 10 observa-se que o grupo tratado com LED apresentou maior intensidade de fluorescência por todo o citoplasma celular, indicando maior produção de ROS. Ainda, é possível observar que as células se apresentaram mais espalhadas e alongadas em comparação ao grupo controle. Essa diferença nos níveis de ROS no grupo LED se dá pela absorção da luz pelo fotorreceptor, que resulta na atividade de várias moléculas, incluindo espécies reativas de oxigênio e estas, posteriormente, atuam como um mensageiro secundário, resultando na ativação e estimulação de várias vias, incluindo síntese de proteínas, migração celular, proliferação celular e enzimas antioxidantes (Dompe *et al.*, 2020).

Já no grupo tratado com H₂O₂, também é possível observar uma alta intensidade de fluorescência pelo corante Cellrox, principalmente ao redor dos núcleos, indicando uma alta produção de ROS (Fig. 10). Todavia, as células apresentaram menor densidade, perderam a sua morfologia e apresentaram sinais de fragmentação devido ao dano celular decorrente do estresse oxidativo. Liu *et al.* (2024) utilizaram o H₂O₂ para induzir o estresse oxidativo em uma linhagem celular de fibroblastos da pele humana. As células apresentaram menor densidade celular e se tornaram menos alongadas, mais largas e menos fusiformes em comparação às células de controle. A geração de ROS intracelular foi detectada usando o reagente CellROX, onde foi constatado que o H₂O₂ aumentou os níveis de ROS, indicativo de estresse oxidativo nas células expostas. As células foram expostas a concentrações crescentes de H₂O₂ (100, 200, 400, 800 e 1.200 µM) por 3 h, sendo as alterações mais perceptíveis de acordo com o aumento da dosagem.

Quando comparamos os resultados do presente estudo com os achados de Xin, Gongo e Hong (2022), pode-se concluir que o estresse oxidativo provocado pelo H₂O₂ reduz o potencial de membrana mitocondrial e leva ao acúmulo de ROS, este por sua vez sobrecarrega a capacidade antioxidante intrínseca, resultando em estresse oxidativo e danos celulares, o que também pode ser observado por meio de alterações na configuração/morfologia celular. A superprodução de ROS promove efeitos deletérios nas biomoléculas celulares e mitocôndrias, acarretando assim, na redução da atividade mitocondrial.

Em contrapartida, as células do grupo que recebeu o pré-tratamento com LED antes da indução ao estresse oxidativo apresentaram nível de fluorescência mais baixo quando comparadas às células do grupo H₂O₂ e do grupo LED isoladamente (Fig. 10). Quando em comparação ao grupo H₂O₂, a FBM induziu as células a recuperarem a sua morfologia, retornando à forma espalhada e alongada. Ainda, é possível observar aumento da população celular (Fig. 10), confirmando os resultados obtidos no ensaio de atividade mitocondrial.

Rossato et al. (2025) utilizaram o LED a 660 nm como pré-tratamento em células SH-SY5Y incubadas com H₂O₂, observando o efeito neuroprotetor da FBM, que, por meio do aumento de ATP e da redução de ROS, preservou a atividade mitocondrial e a viabilidade celular, aumentando assim a sobrevivência e a proliferação celular diante do estresse oxidativo, promovendo defesas antioxidantes e melhorando a função mitocondrial.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com H₂O₂ induz danos oxidativos em fibroblastos L929, pela elevação dos níveis de ROS intracelular, bem como diminuição da atividade mitocondrial, do potencial de membrana mitocondrial e pela perda da morfologia das células. Estes achados corroboram com estudos anteriores que destacam o uso do H₂O₂ como um indutor de senescência prematura e estresse oxidativo em linhagens celulares (Chou *et al.*, 2023; Cui *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2024; Miwa *et al.*, 2022; Ransy *et al.*, 2020; Tsai *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2020; Vilema-enríquez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2024b).

Por meio dos ensaios realizados, pôde-se comparar metabolicamente e morfológicamente o comportamento das células diante do estresse oxidativo quando pré-tratadas com LED ou na ausência dele. Assim, somando com os resultados obtidos pelo ensaio de atividade mitocondrial, observou-se que o uso do LED induziu melhoras nas características morfológicas das células e promoveu manutenção da homeostase celular nas células L929, sugerindo um papel antioxidante. Estes achados corroboram estudos anteriores que demonstram que a FBM pode auxiliar na recuperação celular e reduzir o estresse oxidativo (Asgari *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2020; De Marchi *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013; Rossato *et al.*, 2025; Zabeu, 2022; Yang *et al.*, 2020).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o pré-tratamento com a irradiação simultânea do LED 660 e 850 nm exerce efeito protetor contra a ação do H_2O_2 em células fibroblásticas L929, por meio da manutenção da viabilidade celular, da atividade mitocondrial, diminuição da produção de ROS e preservação da morfologia celular. Desta forma, a FBM pode ser utilizada para auxiliar a prevenir e mitigar danos oxidativos, com possíveis aplicações em contextos clínicos e terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LOPES, L. *et al.* Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 179–184, 2001.
- AMORIM, F. C. M. *et al.* Estudo pré-clínico de queimaduras experimentais tratadas com fotobiomodulação e membrana amniótica humana, isoladas e associadas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem.**, v. 31, p. 1-11, 2023.
- ASGARI, R. *et al.* Management of oxidative stress for cell therapy through combinational approaches of stem cells, antioxidants, and photobiomodulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 196, p. 106715, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098724000265>. Acesso em: 9 set. 2025.
- ASH, C. *et al.* Effect of wavelength and beam width on penetration in light tissue interaction using computational methods. **Lasers in Medical Science.**, v. 32, n. 8, p. 1909–1918, 2017.
- BAECK, J.; LEE, M. G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. **Redox Report**, v. 21, n. 4, p. 164–169, 2016.
- BARASCU, A. *et al.* Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. **EMBO Journal**, v. 31, n. 5, p. 1080–1094, 2012.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BUENO, J.; CRISTOFOLINI, G. M. A. F. LED terapia na faixa do vermelho ao infravermelho: uma nova abordagem sob a visão quântica para a saúde. **Revista Saúde Quântica**, v. 3, n. 3, p. 102-110, 2014.
- CHAUDHARY, M.; KHAN, A.; GUPTA, M. Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. **Current Aging Science.**, v. 13, n. 1, p. 22-30, 2020.
- CHAVES, M. E. A. *et al.* Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **Anais Brasileiros de Dermatologia.**, v. 89, n. 4, p. 616–623, 2014.
- CHEN, H. *et al.* Effect of photobiomodulation on CCC-ESF reactive oxygen species steady-state in high glucose mediums. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 3, p. 555–562, 2020.
- CHEN, J. J. *et al.* Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. **International of Cosmetic Science**, v. 43, n. 5, p. 495-509, 2021.

CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 10, p. 4130–4134, 1994.

CHITTIBOYINA, S.; BAI, Y.; LELIÈVRE, S. A. Microenvironment-Cell Nucleus Relationship in the Context of Oxidative Stress. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 6, p. 23, 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00023/full>. Acesso em: 5 set. 2025.

CHOU, M.-H. *et al.* Potential of methacrylated acemannan for exerting antioxidant-, cell proliferation-, and cell migration-inducing activities in vitro. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 204, 2023. Disponível em: <https://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-023-04022-8>. Acesso em: 29 ago. 2025.

CHUNG, H. *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (Light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.

COUTURAUD, V. *et al.* Reverse skin aging signs by red light photobiomodulation. **Skin Research and Technology**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. e13391, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/srt.13391>. Acesso em: 3 set. 2025.

CSEKES, E.; RAČKOVÁ, L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12641, 2021.

CUI, L. *et al.* Anti-skin Aging Potential of *Sargassum thunbergii* Ethanolic Extract: Antioxidant, Anti-inflammatory, and Antiwrinkle Effects on L929 Fibroblast Cells. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 2023, p. 1–16, 2023. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jfpp/2023/2230456/>. Acesso em: 29 ago. 2025.

LIMA, Elessandro Váguino. **Fotobiomodulação em células musculares e na articulação glenoumeral em simulação da puxada em técnicas de judô**. 2023. 82f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2023.

DE MARCHI, T. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 231–236. 2011.

DOMPE, C. *et al.* Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1724, 2020.

DOS SANTOS, Anaeliza Figueiredo. **Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais**. 2020. Dissertação (Mestrado em Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

DOS SANTOS, S. A. *et al.* Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

E SILVA, V. D. U. **Avaliação da Fotobiomodulação a Laser no Reparo Tecidual em Ratos Submetidos à Dieta Hiperlipídica**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Odontologia e Saúde), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ETEMADI, A. *et al.* Photobiomodulation Effect of Different Diode Wavelengths on the Proliferation of Human Gingival Fibroblast Cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 97, n. 5, p. 1123–1128, 2021.

FACCHIN, F. *et al.* Comparison of oxidative stress effects on senescence patterning of human adult and perinatal tissue-derived stem cells in short and long-term cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 13, p. 1486–1501, 2018.

FAN, X.; HUSSIEN, R.; BROOKS, G. A. H₂O₂-induced mitochondrial fragmentation in C2C12 myocytes. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 11, p. 1646–1654, 2010.

FERRARESI, C.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1273–1299, 2016.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos e mecanismo de lesão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–69, 1997.

FURUKAWA, M. *et al.* Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on Human Gingival Fibroblasts In Vitro. **Operative Dentistry**, v. 40, n. 4, p. 430–439, 2015.

GARG, C.; SHARMA, H.; GARG, M. Skin photo-protection with phytochemicals against photo-oxidative stress, photo-carcinogenesis, signal transduction pathways and extracellular matrix remodeling—An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 62, p. 101-127, 2020.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. 456p.

GLASS, G. E. Photobiomodulation: The Clinical Applications of Low-Level Light Therapy. **Aesthetic Surgery Journal**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 723–738, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/asj/article/41/6/723/6104785>. Acesso em: 28 ago. 2025.

GU, Y. *et al.* Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 59, p. 101036, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156816371930474X>. Acesso em: 28 ago. 2025.

HEO, J.-C. *et al.* Photobiomodulation (660 nm) therapy reduces oxidative stress and induces BDNF expression in the hippocampus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p.

10114, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-46490-4>. Acesso em: 5 set. 2025.

HERNÁNDEZ-BULE, M. F. *et al.* Unlocking the Power of Light on the Skin: A Comprehensive Review on Photobiomodulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4483–4483, 2024.

HUANG, Y. Y. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. **Journal of Biophotonics**, v. 6, p. 829-838, 2012.

JAFFRI, J. MD. Reactive Oxygen Species and Antioxidant System in Selected Skin Disorders. **Malaysian Journal of Medical Sciences.**, v. 30, n. 1, p. 7–20, 2023.

JUAN, C. A. *et al.* The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4642, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4642>. Acesso em: 5 set. 2025.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 355–361, 1 2005.

KARU, T. I. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 3, n. 4, p. 638, 1989.

KIM, J.; WON, J. Y. Effect of Photobiomodulation in Suppression of Oxidative Stress on Retinal Pigment Epithelium. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 6413, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/12/6413>. Acesso em: 28 ago. 2025.

LAFFITTE, C. M. *et al.* Effect of nutritional stress and photobiomodulation protocol on in vitro viability and proliferation of murine preosteoblast cells. **Lasers in Medical Science**, v. 39, n. 1, p. 289, 2024.

LAGO, A. D. N. **Laser na odontologia: Conceitos e Aplicações Clínicas**. São Luís: EDUFMA, 2021. 315p.

LANG, X. *et al.* The Mechanism of Catalpol to Improve Oxidative Damage of Dermal Fibroblasts Based on Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. **Drug Design, Development and Therapy.**, v. 18, p. 2287–2297, 2024.

LEE, J. *et al.* *In vitro* investigation of the antibacterial and anti-inflammatory effects of LED irradiation. **Journal of Periodontal & Implant Science**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 110, 2023. Disponível em: <https://jpis.org/DOIx.php?id=10.5051/jpis.2200920046>. Acesso em: 29 ago. 2025.

LEE, Y-J. *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. **Experimental Cell Research**, v. 291, n. 1, p. 251–266, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00391-4) . Acesso em: 9 set. 2025.

LENNICKE, C. *et al.* Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 39, 2015. Disponível em: <http://www.biosignaling.com/content/13/1/39>. Acesso em: 5 set. 2025.

LI, YF. *et al.* Caffeine Protects Skin from Oxidative Stress-Induced Senescence through the Activation of Autophagy. **Theranostics**, v. 8, n. 20, p. 5713-5730, 2018.

LIMA, E. V.; PACHECO-SOARES, C.; SILVA, N. S. Photobiomodulation assay of muscle cells C2C12 after irradiation with LED device. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2022.

LIU, S.-H. *et al.* Aquaporin-8 promotes human dermal fibroblasts to counteract hydrogen peroxide-induced oxidative damage: A novel target for management of skin aging. **Open Life Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 20220828, 2024. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/biol-2022-0828/html>. Acesso em: 9 set. 2025.

LUO, L. *et al.* Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p. 725–734, 2013.

MACEDO, S. R. *et al.* Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

MAGHFOUR, J. *et al.* Photobiomodulation CME Part I: Overview and Mechanism of Action. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 91, n. 5, p. 793–802, 2024.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L; KARU, T. I. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: Apperance of giant mitochondria. **J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 38, p. 25-30, 1997.

MARTELLI, F.; MORAIS, F. N. Radicais livres. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 54–57, 2014.

MICHALAK, M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 585, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/2/585>. Acesso em: 5 set. 2025.

MIWA, S. *et al.* Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 132, n. 13, p. e158447, 2022. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/158447>. Acesso em: 29 ago. 2025.

MOKOENA, D. R. *et al.* Photobiomodulation at 660 nm Stimulates Fibroblast Differentiation. **Lasers in Surgery and Medicine.**, v. 52, n. 7, p. 671– 681, 2020.

NASUK, Guilherme Rabelo. **Efeito da terapia de fotobiomodulação na expressão de biomarcadores de estresse oxidativo em células HUVEC submetidas à hipóxia.** 2023. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina – Ciências da Saúde) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2023.

OHTANI, N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis?. **Inflammation and Regeneration**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 11, 2022. Disponível em: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-022-00197-8>. Acesso em: 29 ago. 2025.

PARK, W. H. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 4, p. 1235–1240, 2013.

ORIÁ, R. B. *et al.* Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 425–434, 2003.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2017, n. 1, p. 8416763, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2017/8416763>. Acesso em: 28 ago. 2025.

RANSY, C. *et al.* Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 9149, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9149>. Acesso em: 5 set. 2025.

RAVERA, S. *et al.* Mitochondrial Bioenergetic, Photobiomodulation and Trigeminal Branches Nerve Damage, What's the Connection? A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4347, 2021.

REILLY, D. M.; LOZANO, J. Skin collagen through the lifestages: importance for skin health and beauty. **Plastic and Aesthetic Research**, [s. l.], v. 8, p. 2, 2021. Disponível em: <https://www.oaepublish.com/articles/2347-9264.2020.153>. Acesso em: 28 ago. 2025.

REN, C. *et al.* Effect of diode low-level lasers on fibroblasts derived from human periodontal tissue: a systematic review of in vitro studies. **Lasers in Medical Science.**, v. 31, n. 7, p. 1493–1510, 2016.

ROSSATO, R. C. *et al.* **Neuroprotective Effects of Photobiomodulation and Taurine on SH-SY5Y Cells.** [S. l.]: Biology and Life Sciences, 2024. Disponível em: <https://www.preprints.org/manuscript/202404.0362/v1>. Acesso em: 28 ago. 2025.

ROSSATO, R. C. *et al.* Photobiomodulation by LED 660 nm and Taurine against H₂O₂ oxidative stress in SH-SY5Y cells. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 211, 2025. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10103-025-04467-y>. Acesso em: 28 ago. 2025.

RYU, J. H. *et al.* Exploring the Effects of 630 nm Wavelength of Light Emitting Diode Irradiation on the Proliferation and Migration Ability of Human Biceps Tendon Fibroblast Cells. **CiOS Clinics in Orthopedic Surgery**, v. 15, n. 1, p. 166–174, 2023.

SANTOS, Maria José Bryanne Araujo. **Avaliação do efeito protetor do ácido fítico contra o dano ao dna induzido por estresse oxidativo**. 2022. 64f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2022.

SARSOUR, E. H. *et al.* Redox Control of the Cell Cycle in Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 2985–3011, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIMAS, L. A. W.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 80-85, 2019.

SOARES, L. E. S. Transcutaneous laser irradiation of blood in simultaneous mode (S-ILIB) for fatigue recovery. **Revista Univap**, v. 30, n. 67, 2024.

SPORTLLUX. **Sportllux Ultra**. 2025. Disponível em: <https://www.sportllux.com.br/produtos/sportllux-ultra>. Acesso em: 09 set. 2025.

TSAI, W. C. *et al.* The protective ability and cellular mechanism of Koelreuteria henryi Dummer flower extract against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative damage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 89–99, 2020.

VIEIRA, A. *et al.* Cytotoxic effects of hydrogen peroxide on periodontal cells. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 60, n. 3, p. 111–117, 2020.

VILEMA-ENRÍQUEZ, G. *et al.* Molecular and Cellular Effects of Hydrogen Peroxide on Human Lung Cancer Cells: Potential Therapeutic Implications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

VINCK, E. M. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 2, p. 95–99, 2003.

VOLPATO, L. E. R. *et al.* Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. **Journal of Biomedical Optics**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 075004, 2011. Disponível em:

<http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3602850>.
Acesso em: 29 ago. 2025.

WANG, Z. X.; KIM, S. H. Effect of Photobiomodulation Therapy (660 nm) on Wound Healing of Rat Skin Infected by Staphylococcus. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 38, n. 7, p. 419–424, 2020.

XIN, X.; GONG, T.; HONG, Y. Hydrogen peroxide initiates oxidative stress and proteomic alterations in meningotheial cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 14519, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-18548-3>. Acesso em: 9 set. 2025.

YADAV, A.; GUPTA, A. Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.**, v. 33, n. 1, p. 4–13, 2017.

YANG, L. *et al.* Mitochondria as a target for neuroprotection: role of methylene blue and photobiomodulation. **Translational Neurodegeneration**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 19, 2020. Disponível em: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-020-00197-z>. Acesso em: 28 ago. 2025.

YANG, L. *et al.* Non-invasive photobiomodulation treatment in an Alzheimer Disease-like transgenic rat model. **Theranostics**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 2205–2231, 2022. Disponível em: <https://www.thno.org/v12p2205.htm>. Acesso em: 28 ago. 2025.

ZABEU, A. M. C. *et al.* Estresse oxidativo em células SH-SY5Y diante da exposição ao peróxido de hidrogênio. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e30811326474, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26474>. Acesso em: 29 ago. 2025.

ZABEU, A. M. C. **Viabilidade citotoxicidade pré e pós-tratamentos 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.

ZHANG, D. *et al.* Puerarin-Loaded Electrospun Patches with Antinflammatory and Pro-Collagen Synthesis Properties for Pelvic Floor Reconstruction. **Advanced Science.**, v. 11, n. 21, 2024b.

ZHANG, J. *et al.* Aging in the dermis: Fibroblast senescence and its significance. **Aging Cell.**, v. 23, n. 2, p. 1-11, 2024a.

ZHANG, P.; WU, M. X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 1, p. 173–180, 2018.

ZHANG, Y. *et al.* cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light. **Journal of Investigative Dermatology.**, v. 120, n. 5, p. 849–857, 2003.

ZHAO, H. *et al.* Comparative study on Photobiomodulation between 630 nm and 810 nm LED in diabetic wound healing both *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 02, p. 2250010, 2022. Disponível em: <https://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S1793545822500109>. Acesso em: 3 set. 2025.

ZUO, X. *et al.* Protective Effect of Photobiomodulation against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage by Promoting Autophagy through Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Pathway in MC3T3-E1 Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–18, 2022.