

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Rafaella Carvalho Rossato

**Fotobiomodulação e taurina em neuroblastoma humano: estudo *in vitro* da doença de
Alzheimer**

São José dos Campos – SP
2022

RAFAELLA CARVALHO ROSSATO

**FOTOBIMODULAÇÃO E TAURINA EM NEUROBLASTOMA HUMANO:
ESTUDO *IN VITRO* DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito necessário para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Rossato, Rafaella Carvalho
Fotobiomodulação e taurina em neuroblastoma humano: estudo in vitro da doença de Alzheimer / Rafaella Carvalho Rossato; orientadora, Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares. - São José dos Campos, SP, 2022.
1 CD-ROM, 54 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. Doença de Alzheimer. 3. Neuroproteção. 4. Estresse Oxidativo. I. Pacheco Soares, Profa. Dra. Cristina, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Rafaella Carvalho Rossato, 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, 10 de Maio de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa:

04, 03, 2

RAFAELLA CARVALHO ROSSATO

“FOTOBIMODULAÇÃO E TAURINA EM NEUROBLASTOMA HUMANO: ESTUDO *In vitro* DA DOENÇA DE ALZHEIMER”.

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.^ª DR.^ª JULIANA FERREIRA STRIXINO _____

PROF.^ª DR.^ª CRISTINA PACHECO SOARES _____

PROF.^ª DR.^ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA _____

PROF.^ª DR.^ª GEISA NOGUEIRA SALLES – Anhanguera _____

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 04 de março 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele eu não teria forças para concluir essa jornada.

Aos meus pais Roberto e Escolástica pelo carinho e apoio de sempre, não medindo esforços para que eu pudesse chegar até esta etapa de minha vida.

Ao meu marido José Luís, que sempre esteve ao meu lado apoiando todas as decisões e acreditando no meu potencial.

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Laís e minha sobrinha Maria, que me fizeram sentir mais leve durante essa jornada.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Cristina Pacheco Soares por ter me aceitado em seu laboratório desde o início da minha graduação, ensinando em todo este percurso e por ter me aceitado como sua orientanda e me guiar em mais uma etapa.

Aos meus colegas de trabalho, pelas conversas esclarecedoras, contribuição científica, apoio e amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pois sem Ele nada é possível.

Aos meus pais, por toda educação recebida, pelo apoio e estrutura que me deram ao longo da vida.

Ao meu marido que suportou todos os meus momentos de estresse durante o processo. Tenho muita gratidão no coração por fazer parte da minha vida.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Cristina Pacheco Soares e também ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, por construírem um caminho cheio de aprendizado que eu pude explorar.

Aos amigos do Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares, profissionais capazes que pude conviver e aprender com eles as mais diversas áreas do conhecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por todo o apoio recebido. E também ao projeto FINEP do Confocal. 01.13.0275.00.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

FOTOBIMODULAÇÃO E TAURINA EM NEUROBLASTOMA HUMANO: ESTUDO *IN VITRO* DA DOENÇA DE ALZHEIMER

RESUMO

A capacidade de reparo limitada do sistema nervoso central (SNC) é um desafio considerável. A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e altamente prevalente que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. A regeneração completa do SNC ainda não é possível e é procurada por diferentes meios, incluindo terapias medicamentosas e irradiações com LED (*light emission diode*), que são algumas alternativas promissoras para a prevenção, contenção do avanço acelerado das doenças neurodegenerativas e uma possível reconstrução das estruturas do tecido neural. Neste trabalho, propusemos estabelecer e padronizar um modelo *in vitro* da DA utilizando o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para simular o estresse oxidativo característico da DA, realizado em linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Deste modo, o estudo explora os efeitos da taurina em conjunto com LED sob estresse oxidativo, com objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor e também a capacidade de restauração celular posterior ao estresse oxidativo. Pesquisas recentes apontam que o LED tem grande potencial para ser incluído como parte do tratamento da DA, entretanto, tendo a combinação de duas terapias (LED e suplementação com taurina) o resultado poderá ser promissor. Neste trabalho, foi realizada a avaliação do LED no comprimento de onda em 660 nm e taurina como modelo de pré-tratamento e tratamento em células estressadas oxidativamente, avaliando a atividade mitocondrial pelo teste colorimétrico de MTT (quantitativo) e marcação das mitocôndrias de células vivas por fluorescência utilizando *MitoTracker Orange* (qualitativo). Foi avaliada também a viabilidade celular pelo teste de azul de Tripán (quantitativo e qualitativo) e a verificação das estruturas celulares por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) (qualitativo). Ao realizar as análises estatísticas e analisar as imagens, o LED em conjunto com a taurina apresentaram efeitos neuroprotetores somente no pré-tratamento, ou seja, quando a célula é exposta ao LED e taurina e posteriormente estressada com H₂O₂. Comparando a ação dos dois pré-tratamentos em contato com a célula e também quando são expostos ao H₂O₂, pode-se observar que o LED tem maior efeito proliferativo celular em comparação com a taurina.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Neuroproteção; Estresse Oxidativo.

PHOTOBIMODULATION AND TAURINE IN HUMAN NEUROBLASTOMA: IN
VITRO STUDY OF ALZHEIMER'S DISEASE

ABSTRACT

The limited repair capacity of the central nervous system (CNS) is a considerable challenge. Alzheimer's Disease (AD) is a progressive and highly prevalent neurodegenerative disease that affects millions of people worldwide. Complete regeneration of the CNS is not yet possible and is sought by different means, including drug therapies and LED (light emission diode) irradiation, which are some promising alternatives for the prevention, containment of the accelerated advance of neurodegenerative diseases and a possible reconstruction of the neural tissue structures. In this work, we proposed to establish and standardize an in vitro model of AD using hydrogen peroxide (H_2O_2) to simulate the oxidative stress characteristic of AD, performed in a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). Thus, the study explores the effects of taurine in conjunction with LED under oxidative stress, in order to evaluate the neuroprotective effect and also the ability of cellular restoration after oxidative stress. Recent research indicates that LED has great potential to be included as part of the treatment of AD, however, having the combination of two therapies (LED and taurine supplementation) the result may be promising. In this work, the evaluation of LED at wavelength at 660 nm and taurine as a pre-treatment and treatment model in oxidatively stressed cells was performed, evaluating mitochondrial activity by the MTT colorimetric test (quantitative) and labeling of live cell mitochondria by fluorescence using MitoTracker Orange (qualitative). Cell viability was also evaluated by the Trypan blue test (quantitative and qualitative) and the verification of cellular structures by means of the scanning electron microscope (SEM) (qualitative). When performing the statistical analyzes and analyzing the images, LED together with taurine showed neuroprotective effects only in the pre-treatment, that is, when the cell is exposed to LED and taurine and later stressed with H_2O_2 . Comparing the action of the two pre-treatments in contact with the cell and also when they are exposed to H_2O_2 , it can be seen that LED has a greater cell proliferative effect compared to taurine.

Keywords: Alzheimer's Disease; Neuroprotection; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrativo da neuroproteção com taurina e irradiação com LED.	21
Figura 2: Equipamento utilizado para irradiação das placas de cultura celular.	23
Figura 3: Concentrações de H ₂ O ₂ em ordem crescente, realizado pelo ensaio de atividade mitocondrial.	30
Figura 4: Concentrações de H ₂ O ₂ em ordem crescente, realizado pelo ensaio de azul de Tripán - estudo quantitativo.	31
Figura 5: Concentrações de H ₂ O ₂ em ordem crescente, realizado pelo ensaio de azul de Tripán - estudo qualitativo.	32
Figura 6: Atividade mitocondrial em resposta de diferentes densidades de energia do LED. .	34
Figura 7: Diferentes densidades de energia avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo quantitativo.	35
Figura 8: Diferentes DE avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo qualitativo.	35
Figura 9: Ensaio de atividade mitocondrial com concentrações crescentes de taurina.	37
Figura 10: Concentrações de taurina dispostas em ordem crescente avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo quantitativo.	38
Figura 11: Concentrações de taurina dispostas em ordem crescente avaliada pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo qualitativo.	38
Figura 12: Ensaio de atividade mitocondrial para avaliar o pré-tratamento com LED.	39
Figura 13: Ensaio de atividade mitocondrial para avaliar o pré-tratamento com taurina.	41
Figura 14: Pré-tratamento realizado com LED e taurina sob efeito do H ₂ O ₂ avaliado pelo ensaio atividade mitocondrial.	42
Figura 15: Tratamento realizado com LED e taurina sob efeito do H ₂ O ₂ avaliados pelo ensaio de atividade mitocondrial.	43
Figura 16: Avaliação das mitocôndrias por meio da marcação de fluorescência realizado no pré-tratamento com LED e taurina sob efeito do H ₂ O ₂	44
Figura 17: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo controle nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.	46
Figura 18: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo H ₂ O ₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.	46
Figura 19: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo LED + H ₂ O ₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.	47
Figura 20: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo taurina + H ₂ O ₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.	47
Figura 21: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo LED + taurina + H ₂ O ₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI	<i>Alzheimer's Disease International</i> (Doença de Alzheimer Internacional)
ATP	Adenosina Trifosfato
β A	β -amiloide
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)
CCO	Citocromo C Oxidase
DMEM/F12	<i>Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture</i> (Meio de Eagle Modificado da Gibco Dulbecco: Mistura de Nutrientes)
DMSO	Dimetilsufóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
DA	Doença de Alzheimer
DE	Densidade de Energia
DP	Doença de Parkinson
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
<i>HANK'S</i>	<i>Hanks' Balanced Salt solution</i> (Solução Salina Equilibrada de Hanks)
HMDS	Hexametildissilazano
HSP 70	Proteína de Choque Térmico
IAB	Instituto Alzheimer Brasil
<i>LASER</i>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio)
PA	Parafolmaldeído
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	15
2.1.1	<i>Doença de Alzheimer</i>	15
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	16
2.2.1	<i>Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer</i>	17
2.3	TAURINA E SEUS BENEFÍCIOS	17
2.4	FOTOBIMODULAÇÃO	18
3	JUSTIFICATIVA.....	21
4	OBJETIVOS GERAIS	22
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5	METODOLOGIA	23
5.1	CULTURA DE CÉLULAS	23
5.2	PLAQUEAMENTO	23
5.3	IRRADIAÇÃO COM LED.....	23
5.4	DESENHO EXPERIMENTAL	24
5.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	26
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL (MTT)	26
5.7	ANÁLISE DAS MITOCÔNDRIAS POR FLUORESCÊNCIA	27
5.8	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	27
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
7.1	PADRONIZAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES	30
7.1.1	<i>Dosagens de H₂O₂ para geração de estresse oxidativo</i>	30
7.1.2	<i>Densidades de energia</i>	33
7.1.3	<i>Concentrações de taurina</i>	36
7.2	AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS	39
7.2.1	<i>Pré-tratamento com LED</i>	39
7.2.2	<i>Pré-tratamento com taurina</i>	40
7.3	AVALIAÇÃO DO LED E TAURINA EM CONJUNTO EM CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO	41
7.3.1	<i>Pré-tratamento com LED e taurina sob efeito do H₂O₂</i>	41

7.3.2	<i>Tratamento com LED e taurina sob efeito do H₂O₂</i>	42
7.4	AVALIAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS NO PRÉ-TRATAMENTO POR FLUORESCÊNCIA	43
7.5	AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO MEV	45
8	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) tem esse nome devido ao médico neurologista alemão Dr. Alois Alzheimer que, em 1906, observou alterações no tecido cerebral de uma mulher com um conjunto de confusões mentais. Sabe-se agora que essas características são da doença (DE FALCO *et al.*, 2016).

A DA corresponde a 60% dos quadros demenciais, sendo a mais prevalente em todo o mundo. Atualmente, 35,5 milhões de pessoas convivem com essa doença e a estimativa é que esse número dobre a cada 20 anos. A DA é uma doença de grande impacto, podendo ser acompanhada junto com o crescimento da população idosa, pois a expectativa de vida aumenta a cada ano. Contudo, o diagnóstico tardio, aumentará o número de pessoas com a demência (REITZ; MAYEUX, 2014).

A progressão da doença causa perda dos prolongamentos neurais e comprometimento de seu entorno, levando à atrofia cerebral, pela redução da conectividade entre as sinapses, o metabolismo celular e à perda da capacidade da recuperação neural. Uma das funções afetadas na DA é a cognitiva, responsável pelas execuções de atividades do cotidiano, como perda da capacidade de planejar, dificuldade na produção da fala e escrita, resultando em incapacidade do indivíduo afetado para desempenhar as atividades do cuidar de si mesmo (FURTADO *et al.*, 2014).

Sabe-se que na DA ocorre um estresse oxidativo, liberando espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais, quando produzidas em excesso causam danos nas células. A busca da cura para a DA está sendo bastante explorada, com o objetivo de descobrir diagnóstico precoce da doença e tratamentos mais eficazes. Já se sabe que existem medicamentos que retardam a doença, promovendo maior qualidade de vida ao paciente. Existem também outras alternativas para evitar a progressão da doença, como a fototerapia e também utilização de antioxidantes. No estudo de (LEE *et al.*, 2020) mostraram que a taurina promove um efeito neuroprotetor em células neurais, sendo caracterizada por ser um antioxidante. Contudo, sabe-se que o a fototerapia feita por LED (Diodo Emissor de Luz) ou *laser* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação) são opções de tratamentos não invasivos a fim de melhorar a função cerebral (SALEHPOUR *et al.*, 2018). Portanto, o presente estudo avalia os efeitos da taurina em células neurais em condições de estresse induzidas por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), simulando o estresse oxidativo característico da DA. Também será utilizada em conjunto a fototerapia, com LED, para verificar o comportamento celular e observar se haverá biomodulação celular, conforme a figura 1 demonstra abaixo. Assim, o objetivo é analisar como

as células neurais se comportam em modelo *in vitro* da DA utilizando H_2O_2 e pré-tratadas com taurina em combinação com LED.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O sistema nervoso é responsável pelo processamento de informações mantendo a interação do indivíduo com o ambiente. É um sistema importante para a realização de tarefas diárias e está relacionado aos movimentos, reflexos e sensibilidade e encontra-se comprometido nos processos de envelhecimento (SERENIKI *et. al.*, 2008).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela degeneração e/ou morte dos neurônios, podendo ser de origem genética ou não, causando uma perda progressiva nas funções motoras, fisiológicas e cognitivas (LUCIANA *et al.*, 2017). Existem diversas doenças neurodegenerativas, sendo as mais prevalentes DA e Doença de Parkinson (DP), que estão fortemente relacionadas ao envelhecimento, caracterizadas por morte celular, programada ou resultante de influências externa, em regiões específicas do sistema nervoso central (SNC), podendo ser programada ou resultante de influências externas e que irá levar aos sintomas das doenças (TEIXEIRA *et. al.*, 2010).

No Brasil, não estão disponíveis dados epidemiológicos da população acometidas por doenças neurodegenerativas, nas diferentes classes sociais, pela ausência de diagnóstico precoce. Tal fato traz um grande impacto na vida do paciente e de seus familiares, pelo diagnóstico tardio dessas afecções. É importante a atenção da família com o indivíduo e o apoio de uma equipe multiprofissional para dar a devida assistência, assim podendo retardar a progressão da doença fazendo uma terapia ocupacional, tendo assistência social e psicológica (GIACOBINI; GOLD, 2013)

2.1.1 Doença de Alzheimer

A DA é responsável por 60% dos casos de demências, sendo uma doença neurodegenerativa progressiva, na qual há comprometimento das capacidades neurológicas, cognitivas e comportamentais, na maioria das vezes em indivíduos de idade avançada (FALCO *et al.*, 2016). No estágio inicial da doença, o indivíduo ainda consegue ser independente, porém com alguns lapsos de memória como esquecer palavras, nomes e dificuldade de localizar objetos do cotidiano. O segundo estágio, tipicamente é o mais longo, podendo durar vários anos. Os sintomas nessa fase da doença são mais acentuados, a pessoa pode ter dificuldades em

lembrar detalhes importantes sobre sua vida, confusão de palavras, ficando frustrada e agindo de maneira inesperada. No terceiro estágio, que é o estágio final, os indivíduos perdem a capacidade de responder ao ambiente, perdem as habilidades físicas como sentar, andar e não controlando os movimentos, suas habilidades cognitivas pioram, ficam mais susceptíveis a doença, portanto, necessitam de cuidado permanente (SALAMEH *et al.*, 2015; FISH *et al.*, 2019).

Não se sabe ao certo o motivo do aparecimento da DA, mas são descritas algumas alterações cerebrais, como: o acúmulo do depósito de proteína β -amiloide (β A), anormalmente produzida em excesso, e os emaranhados neurofibrilares, frutos da hiperfosforilação da proteína TAU. Além disso, também ocorre redução do número de células nervosas (neurônios) e das ligações entre elas (sinapses). Consequentemente, a maciça perda sináptica e morte celular causada em regiões cerebrais são responsáveis pelas alterações na função cognitiva, observadas primeiramente no hipocampo e córtex cerebral. Com a progressão da doença, há vasta perda dos prolongamentos neurais levando à atrofia cerebral, diminuindo o peso e volume do encéfalo, o metabolismo e a capacidade de regeneração cerebrais (LUCIANA *et al.*, 2017).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo pode ser um grande fator para o surgimento de uma variedade de doenças neurodegenerativas. Grande parte das teorias de envelhecimento baseia-se na ideia de que o estresse oxidativo cumulativo leva a mutações mitocondriais, disfunção mitocondrial e dano oxidativo (LIN *et al.*, 2006).

O oxigênio (O_2) é essencial para o funcionamento normal dos organismos eucarióticos. Seu papel na sobrevivência está ligado ao seu alto potencial redox, tornando-o um excelente agente oxidante capaz de aceitar elétrons facilmente de substratos reduzidos. Cada tecido tem uma demanda de O_2 , de acordo com sua necessidade. Os neurônios e os astrócitos, principais tipos de células cerebrais, são em grande parte responsáveis pelo consumo massivo de O_2 e glicose. O cérebro representa aproximadamente 2% do peso corporal total e ainda é responsável por consumir mais de 20% de oxigênio (HALLIWELL, 2006; GANDHI; ABRAMOV, 2012).

2.2.1 Estresse Oxidativo na Doença de Alzheimer

Atualmente, devido ao aumento da expectativa de vida, o número de pessoas com doenças neurodegenerativas, como a DA, está acompanhando esse aumento, pois como a população idosa está aumentando, conseqüentemente há um aumento no número de casos. Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, dentre eles o SNC é altamente afetado, pois possui capacidade reduzida de regeneração celular, portanto a morte de neurônios induzida por toxinas ou por processo natural do envelhecimento compromete o SNC (BARBOSA *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo é obtido por meio de formação de ERO, que são normalmente produzidas pelo metabolismo corporal, porém quando produzidas em excesso, a célula perde capacidade de defesa e de reparo, levando a danos nas biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Quando estes danos não são reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula, levando-a a morte por apoptose ou necrose (RABELO, 2012; HUANG *et al.*, 2020)

Deste modo, o efeito do estresse oxidativo nas células tem sido relacionado a diversas doenças, inclusive a DA. Esses efeitos são impulsionados por fatores ambientais e estressores (SULTANA, 2010).

Comumente utiliza-se o H₂O₂ para induzir o estresse oxidativo em neuroblastoma humano, atuando como modelo experimental *in vitro* do estresse observado na DA, pois as ERO produzidas pelo nosso organismo estão dentre os principais fatores que promovem a neurodegeneração na DA (SERENIKI *et al.*, 2008).

2.3 TAURINA E SEUS BENEFÍCIOS

A taurina (ácido 2-amino-etanossulfônico) é um aminoácido livre contendo enxofre, que é abundantemente encontrado em mamíferos. Foi encontrada pela primeira vez na bile do boi, em 1827, sendo um aminoácido não proteico e essencial para o corpo humano (UELAND, 2011). É encontrada em grandes concentrações no coração, retina, músculo esquelético, fígado, rim e no sistema nervoso, sendo necessária para o desenvolvimento normal e sua deficiência leva a defeitos no crescimento, diferenciação tecidual e doenças cardiovasculares. Pode ser sintetizado endogenamente a partir de metionina e cisteína na presença de vitamina B6, mas

para manter os níveis ótimos no organismo, é necessário fazer a suplementação. É um aminoácido que vem chamando muita atenção entre os pesquisadores (MENZIE *et al.*, 2014). Além de ser sintetizada pelo próprio organismo, a taurina também pode ser obtida a partir de carnes, laticínios, aves, peixes e crustáceos. A taurina também exibe seu potencial por ser eficaz contra muitas doenças, conforme observado em modelos animais de diabetes tipo 1 e tipo 2, aterosclerose e distúrbios neurológicos como a DA, DP e Huntington (WÓJCIK *et al.*, 2010; YAMORI *et al.*, 2010; MARCINKIEWICZ; KONTNY, 2014).

A taurina atua como um agente neuroprotetor e possui propriedades neurotransmissoras, tendo a capacidade de induzir hiperpolarização neural, pela presença de enzimas e receptores de síntese de taurina específicos no SNC, e pela presença de um sistema transportador de taurina. Também é importante notar que o aumento do Ca^{2+} intracelular, resultante da excitotoxicidade, leva à privação de neurotrofinas, reduzindo assim significativamente o transporte de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (WU; PRENTICE, 2013). O BDNF é um dos fatores neurotróficos conhecidos por ser de vital importância na preservação dos neurônios. Sua expressão aumentada é considerada um indicador de maior sobrevivência neural no SNC. Em experimentos realizados por Huang *et al.*, 2020 e Zhang *et al.*, 2017 foi relatado que a taurina aumentou a expressão do BDNF após dano neurotóxico ao hipocampo.

Uma das funções importantes da taurina é a neuroproteção. Foi demonstrado que a taurina pode proteger a célula contra lesões induzida por H_2O_2 *in vitro*, reduzindo o estresse do retículo endoplasmático. Acredita-se que as funções neuroprotetoras da taurina são devidas ao seu papel na redução da concentração de Ca^{2+} livre intracelular e sua capacidade antioxidante leva a uma redução no estresse oxidativo (KUMARI; PRENTICE; WU, 2013)(WU; PRENTICE, 2013).

2.4 FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação descreve o uso terapêutico da luz visível e radiação infravermelha para estimular a cura, aliviar a dor, inflamação e prevenir a morte do tecido. Em 1903 NR Finsen recebeu o Prêmio Nobel em reconhecimento à sua contribuição para o tratamento de doenças utilizando a radiação com luz concentrada, abrindo um novo caminho para a ciência médica. A fotobiomodulação descreve o uso da luz como um tratamento para várias doenças

ou distúrbios, há mais de 50 anos, Endre Mester na Hungria, trabalhou com crescimento de cabelo e cicatrização de feridas em camundongos utilizando a terapia com luz (MOSKVIN, 2017; MESTER, 2017).

O uso da terapia com LED ampliou-se muito nos últimos anos, pois há evidências de que o LED, em comparação com o *laser*, apresenta resultados equivalentes, tendo os comprimentos de onda e densidade de potência semelhantes. No entanto, o LED apresenta baixo custo se comparado ao *laser*, apresenta maior vida útil e melhor adequação para uso doméstico. São vários efeitos benéficos obtidos com a utilização do LED em tratamentos, não causa aumento na temperatura no tecido tratado, é uma modalidade não invasiva e está sendo utilizada na modulação da atividade neural (DE FREITAS, HAMBLIN, 2016; SALEHPOUR *et al.*, 2017; HEISKANEN; HAMBLIN, 2018; HAMBLIN, 2019)

Nas últimas décadas, a terapia realizada com LED apresentou efeito positivo em células neurais comprometidas pela DA. Estudos realizados *in vitro*, em modelos animais e condições clínicas, revelaram que o LED regula a função celular, estimula a proliferação, promove a biomodulação no citoesqueleto e a apoptose é reduzida com a irradiação (MORO *et al.*, 2013; MENG; HE; XING, 2013; SALEHPOUR *et al.*, 2017).

O LED tem sido usado para tratamentos de doenças que acometem o cérebro, pois penetra através do couro cabeludo e do crânio. Além disso, ocorrem vários processos intracelulares durante a absorção da energia luminosa, por meio de cromóforos ou fotorreceptores na mitocôndria (SUTHERLAND, 2002). Uma enzima receptora alvo na fotobiomodulação é a Citocromo C Oxidase (CCO), que faz parte do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial. Os fótons são absorvidos pelo CCO, aumentam a atividade enzimática e, conseqüentemente a atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Após a absorção primária de fótons, o aumento da atividade mitocondrial desencadeia efeitos secundários ativando as vias que estão envolvidas no metabolismo energético, homeostase celular e sinalização de sobrevivência celular. Os efeitos secundários da fotobiomodulação amplificam os efeitos primários pela regulação positiva dos níveis da própria proteína CCO, assim criando mais cromóforo alvo (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013; ENENGL; HAMBLIN; DUNGEL, 2020)

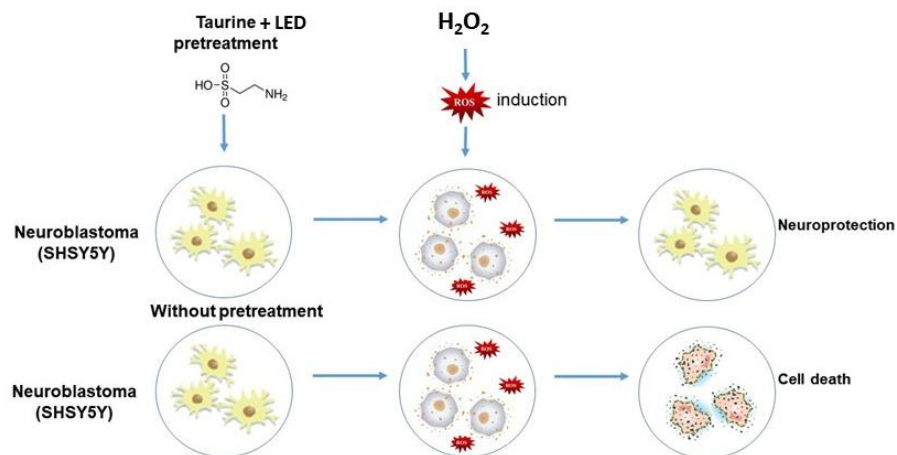
A fotobiomodulação cerebral é uma nova técnica de tratamento que vem sendo aprimorada para a estimulação neural, a fim de melhorar a função cerebral. Na área da neurociência, essa inovação está ganhando espaço principalmente na prática clínica como acidente vascular cerebral, lesões cerebrais, DA, DP e disfunções psicológicas. A terapia com

LED aumenta o fluxo sanguíneo, acelera o metabolismo cerebral e defesas antioxidantes (NAWASHIRO *et al.*, 2012; ROJAS; BRUCHEY, GONZALEZ-LIMA, 2012; SALEHPOUR *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Alzheimer Brasil (IAB) e *Alzheimer's Disease International* (ADI), atualmente, 50 milhões de pessoas convivem com a DA e estudos apontam que este número poderá duplicar a cada 20 anos. No Brasil, cuja população idosa é de aproximadamente 15 milhões, a estimativa para demência é de 1,1 milhão (Ministério da Saúde, Brasil, 2013). Estima-se que, em 2050, o número de pessoas com doença neurodegenerativa, chegue aos 152 milhões, segundo os dados fornecidos pelo IAB. Entretanto, as opções atuais de tratamentos para tal doença não são totalmente eficazes. Por outro lado, estudos recentes indicam que a taurina em baixas concentrações tem propriedades benéficas em patologias neurodegenerativas e a irradiação com LED apresenta efeito biomodulador sobre as células. Por isso é importante realizar estudos *in vitro* a fim de contribuir e elucidar o comportamento de células de neuroblastoma humano frente ao estresse oxidativo gerado por H_2O_2 , simulando as características da DA, assim verificando se haverá biomodulação celular, conforme a figura 1 demonstra abaixo.

Figura 1: Esquema demonstrativo da neuroproteção com taurina e irradiação com LED.



Fonte: Autora

4 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos neuroprotetores e restauradores do LED e taurina, isoladamente ou em conjunto sobre um modelo de Doença de Alzheimer, *in vitro*, utilizando a linhagem celular SH-SY5Y sendo induzido o estresse oxidativo pelo H₂O₂.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Determinar a concentração ideal de H₂O₂ para indução de estresse oxidativo;
- B) Determinar a concentração antioxidante ideal de taurina;
- C) Determinar a fluência ideal de irradiação com LED;
- D) Verificar a capacidade de neuroproteção e neurorestauração da taurina associada ao LED.

5 METODOLOGIA

5.1 CULTURA DE CÉLULAS

Os experimentos foram realizados com a linhagem celular SH-SY5Y (Neuroblastoma Humano ATCC - CRL-2266), gentilmente cedida pelo Laboratório de Neurociências da Universidade de São Paulo (USP). O cultivo foi realizado em garrafas de cultura celular 25 cm² com meio DMEM/F12 (*Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antimicótico, à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

5.2 PLAQUEAMENTO

As células SH-SY5Y foram plaqueadas 1x10⁵ células/poço em placas de 24 poços, com meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, sendo incubadas em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂, *overnight* para adesão das células.

5.3 IRRADIAÇÃO COM LED

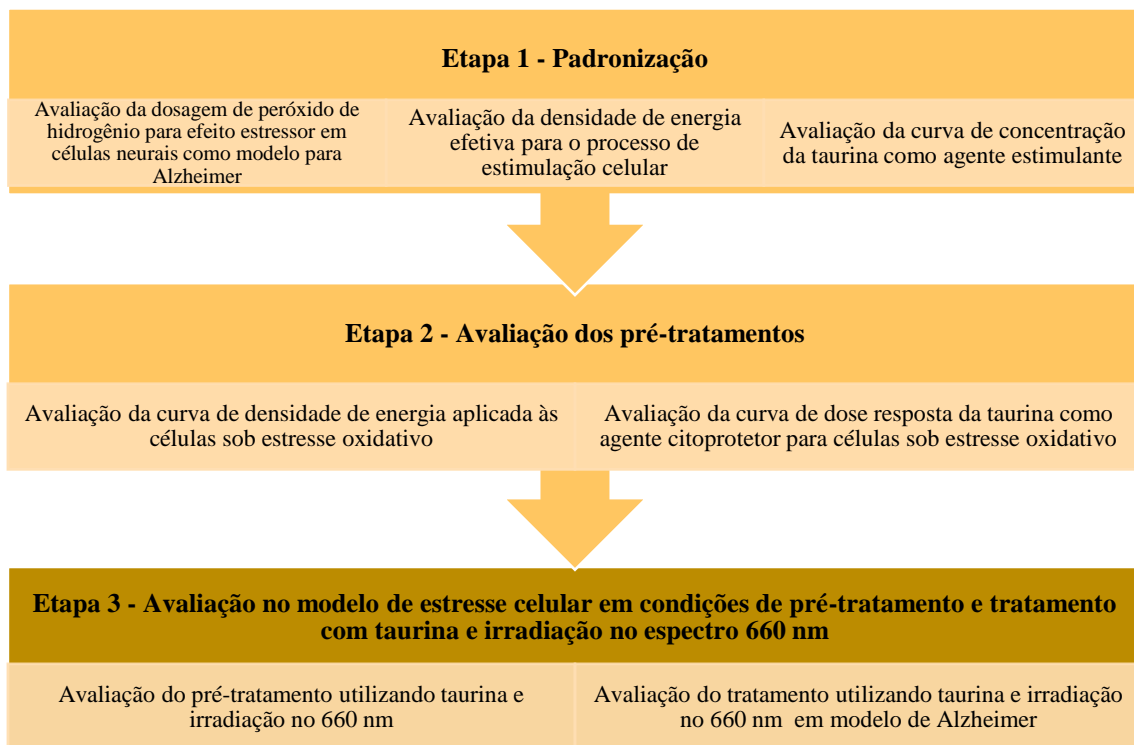
A irradiação foi realizada com o dispositivo LED Biopdi/Irrad-Led5 660 (Biopdi – São Carlos, São Paulo, Brasil – Laboratório de Fotobiologia Aplicado a Saúde – IP&D, UNIVAP). Os parâmetros de irradiação utilizados foram: comprimento de onda de 660 nm ± 5 nm. O equipamento LED Biopdi/Irrad-Led5 consiste em um sistema de 54 LEDs para irradiação, sendo cada LED com potência de 70 mW, cobrindo área de 150 cm², apresentando uma potência por área (irradiância) de até 25 mW/cm². Após a irradiação, as células foram incubadas por 24 h a uma temperatura de 37 °C e 5% CO₂ (MORAES *et al.*, 2019).

Figura 2: Equipamento utilizado para irradiação das placas de cultura celular.



Fonte: Autora

5.4 DESENHO EXPERIMENTAL



- **Etapa 1 – Padronização**

Foi efetuada a padronização da dosagem do H_2O_2 para ser utilizada como modelo experimental *in vitro* da DA. Foi realizada a curva de dosagens de H_2O_2 , para verificar a ação nas células no período de 24 h, sendo que o efeito desejável é que as células fiquem estressadas, diminuindo sua viabilidade em pelo menos 50%, de modo que não matasse toda a população celular. Portanto, foram distribuídos os seguintes grupos: controle (sem interação com o H_2O_2), 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM e 2,5 mM. Realizada essa curva de concentrações, foi

determinada a concentração ótima, que diminuiu significativamente a viabilidade celular, para a continuidade dos experimentos.

Ainda no processo de padronização, foi realizada a comparação de diversas densidades de energia (DE) do LED, com comprimento de onda em 660 nm em células SH-SY5Y por 24 h, com o intuito de aumentar a viabilidade celular por meio da fotobiomodulação. Portanto, foram distribuídos os seguintes grupos: Grupo controle (sem irradiação), 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² e 10 J/cm², com o intuito de observar qual a DE promoveu maior viabilidade celular, sendo selecionada apenas uma para a continuação dos experimentos.

Foi também realizada a curva de dosagens de taurina, para verificar sua interação com as células SH-SY5Y no período de 24 h, com o objetivo de aumentar a viabilidade celular. Foram definidos os seguintes grupos: Grupo controle (sem interação com taurina), 0,05 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 3,0 mg/mL, sendo definido apenas uma dosagem para a continuação dos experimentos.

- **Etapa 2 - Avaliação dos pré-tratamentos**

Após a determinação da melhor dosagem de H₂O₂ para a indução do estresse oxidativo, foi feita a interação dos pré-tratamentos (LED e taurina) com o H₂O₂. Portanto, primeiramente as células foram plaqueadas e após sua adesão, foram irradiadas com LED 660 nm nas DE de 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² e 10 J/cm² e deixadas incubando por 24 h em estufa. Posteriormente, foi retirado o meio de cultura e adicionado H₂O₂ diluído em meio de cultura na dosagem escolhida por 24 h em estufa. Após realizado o pré-tratamento, foi feita a análise de atividade mitocondrial (MTT).

Da mesma forma, foi efetuada a interação da taurina em diversas dosagens com o H₂O₂ já na concentração determinada. Sendo assim, as células foram plaqueadas e após sua adesão foram colocadas as dosagens de taurina diluídas em meio de cultura nas seguintes concentrações: 0,05 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 3,0 mg/mL e deixadas por 24 h em estufa. Em seguida foi colocado o H₂O₂ diluído em meio de cultura, na dosagem determinada para indução do estresse oxidativo, e deixado por 24 h em estufa.

- **Etapa 3 - Avaliação do modelo de estresse celular em condições de pré-tratamento e tratamento com taurina e irradiação no espectro 660 nm**

Após a determinação de todas as concentrações, foi realizado um pré-tratamento, ou seja, as células foram plaqueadas e após sua adesão foram adicionados os agentes para os pré-tratamentos (LED e taurina) nas concentrações ideais nas células e deixadas incubando em estufa por 24 h. Depois, foi retirado o meio de cultura e adicionado H_2O_2 por 24 h em estufa. Nesse experimento a comparação dos pré-tratamentos foi realizado com o grupo H_2O_2 , para verificar se houve a neuroproteção. Portanto, foram determinados os seguintes grupos: Controle, H_2O_2 (estresse oxidativo), LED + H_2O_2 , taurina + H_2O_2 e LED + taurina + H_2O_2 .

Também foi realizado o tratamento utilizando LED e taurina, ou seja, as células foram plaqueadas e após sua adesão foi colocado H_2O_2 na concentração determinada por 24 h em estufa. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se taurina nas concentrações já determinadas por 24 h em estufa. Foram realizados os seguintes grupos: Controle; H_2O_2 (estresse oxidativo); H_2O_2 + LED; H_2O_2 + taurina; H_2O_2 + LED + taurina. Os experimentos de pré-tratamento e tratamento foram avaliados pelo ensaio de atividade mitocondrial (MTT).

5.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante azul de Tripán (Sigma). Após os tratamentos realizados com as células SH-SY5Y, foi retirado o meio de cultura cuidadosamente, utilizou-se 150 μ L de azul de Tripán a 0,2% por 5 minutos, em seguida lavou-se com PBS e adicionou-se mais 150 μ L de PBS para a realização da contagem no microscópio óptico de luz branca (Leica)(SALLES *et al.*, 2017).

Esse teste avalia a integridade de membrana das células, ao entrar em contato com o corante. Quando as células estão viáveis, não absorvem o corante. Já as células mortas, o corante é penetrado obtendo a coloração azul característica, e assim é contabilizado a quantidade de células vivas e mortas dentro de um determinado grupo a ser analisado.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL (MTT)

A análise da atividade mitocondrial foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma). Após realizar os devidos tratamentos, 300 μ L da solução de MTT a 0,5 mg/mL diluídos em meio de cultura foram adicionados em cada poço e incubados por 3 h a 37°C, em 5% de CO_2 . Após esse período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e as células foram incubadas com 400 μ L de

dimetilsulfóxido (DMSO) por 5 minutos sob agitação e a leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm (GRANATO *et al.*, 2018).

5.7 ANÁLISE DAS MITOCÔNDRIAS POR FLUORESCÊNCIA

MitoTracker Orange chloromethyltetramethylrosamine (CMTMRos) (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi usado para marcar mitocôndrias em células vivas. As células cultivadas sobre lamínulas foram incubadas em 500 η M de *MitoTracker Orange* em meio de cultura pré-aquecido por 20 min a 37 °C em estufa de CO₂. A solução de coloração foi lavada três vezes em *Hank's (Hanks' Balanced Salt solution)* e fixadas com paraformaldeído (PA) a 4% por 15 min. Após esse tempo, as lamínulas foram colocadas em lâminas contendo DAPI (P36931, Sigma-Aldrich). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser invertido Zeiss (XUN *et al.*, 2012).

5.8 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

A fim de visualizar os efeitos morfológicos após a terapia, as células foram avaliadas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isto, as mesmas passaram pelas seguintes etapas:

- **Fixação:** Utilizou-se uma solução fixadora, contendo cacodilato de sódio (0,1M), Glutaraldeído (2,5%) e PA (4%). Foram deixadas fixando por 1 h e após esse período, foi retirada a solução fixadora e lavadas 2x com PBS.
- **Desidratação:** a desidratação foi realizada por uma série de concentrações crescentes de etanol sendo elas: etanol a 30%, 50%, 70% e 100%, por 10 minutos cada passagem, sendo a penúltima etapa com etanol a 100% + HMDS (Hexametildissilazano) (1:1) por 10 minutos e HMDS puro por 10 minutos. Retirou-se o HMDS após esse tempo e deixou-se secar em estufa até o dia da metalização.
- **Metalização:** após a secagem, as lamínulas foram retiradas e o material foi metalizado no equipamento EMITECH K 550 X® que tem a função de pulverizar metais não oxidantes como ouro e platina sobre as amostras.

- Análise: a análise foi realizada por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura EVO-Zeiss® sendo capturadas as imagens dos grupos Controle; H₂O₂; LED + H₂O₂; taurina + H₂O₂; LED + taurina + H₂O₂, assim verificando as alterações na morfologia celular (SALLES, *et al.* 2018; ROSSATO *et al.*, 2020)

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram comparados pelo teste de ANOVA ONE-WAY e TWO-WAY, sendo confirmado pelo teste Tukey. A significância estatística foi admitida com $p < 0,05$ sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; considerado significativo, muito significativo e extremamente significativo, respectivamente. Para a realização das análises estatísticas e gráficos foi utilizado o software GraphPad Prisma 5®.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

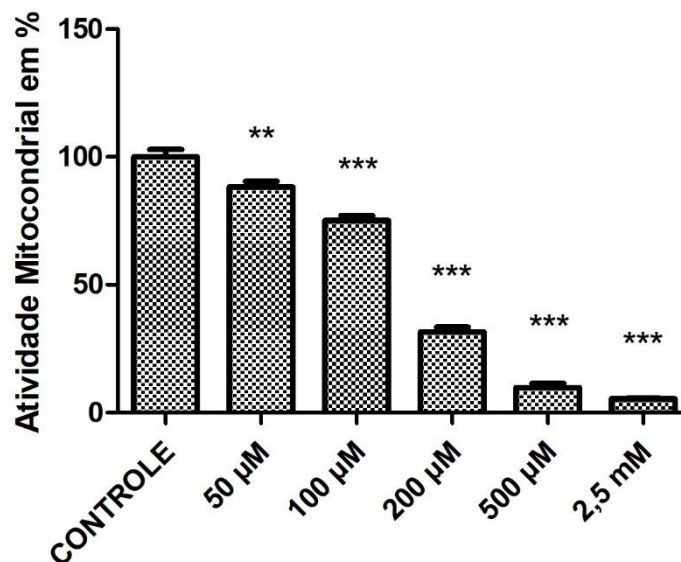
Os resultados a seguir estão divididos em tópicos de acordo com o desenho experimental (item 5.4.).

7.1 PADRONIZAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES

7.1.1 Dosagens de H_2O_2 para geração de estresse oxidativo

Para verificar a atividade mitocondrial, as células foram expostas a diferentes concentrações de H_2O_2 , objetivando padronizar uma dosagem que não inviabilizasse as células, conforme demonstra a figura 3. Os dados estão dispostos em ordem crescente da concentração de H_2O_2 , durante o intervalo de 24 h. Sendo o primeiro grupo controle, em seguida as demais concentrações distribuídas de 50 μ M até 2,5 mM. O grupo na concentração de 50 μ M apresentou diferença estatística com $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle, enquanto as demais concentrações tiveram diferença estatística, com $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle.

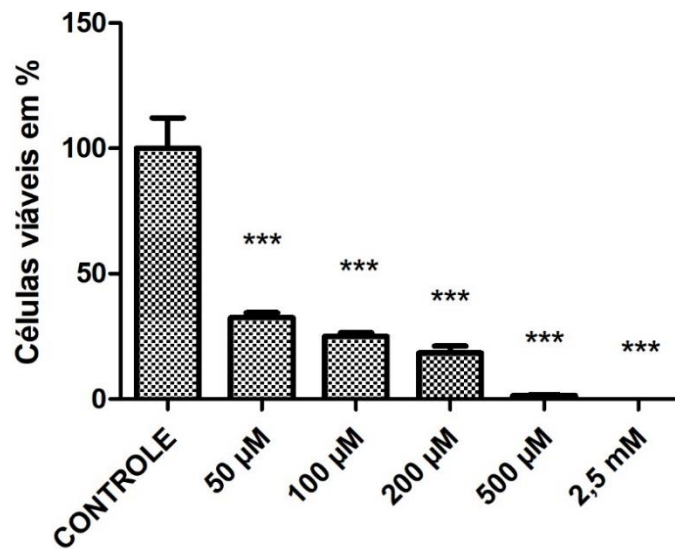
Figura 3: Concentrações de H_2O_2 em ordem crescente, realizado pelo ensaio de atividade mitocondrial.



Fonte: Autora

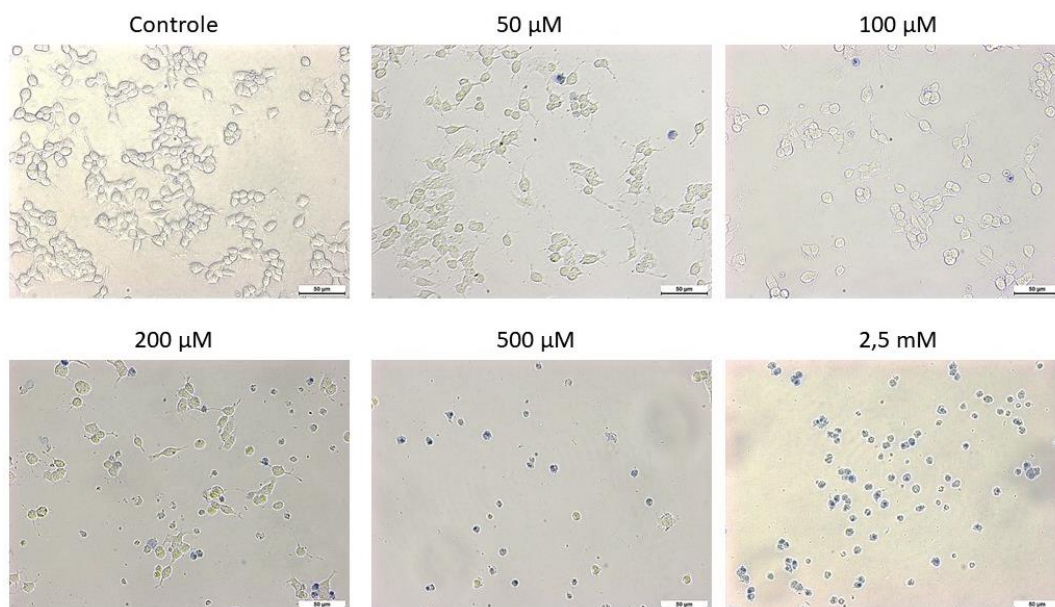
Para o teste de viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de azul de Tripán, que tem objetivo realizar a marcação de células mortas coradas em azul e as vivas sem coloração. Foram adicionadas diferentes concentrações de H_2O_2 por 24 h, em contato com as células, aumentando gradativamente a concentração a partir de $50 \mu M$ até a concentração de $2,5 \text{ mM}$ e um grupo controle sem a interferência do H_2O_2 , conforme demonstrado na figura 4 e 5 por estudo quantitativo e qualitativo respectivamente. Ao observar a figura 4, todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle, com $p < 0,001$.

Figura 4: Concentrações de H_2O_2 em ordem crescente, realizado pelo ensaio de azul de Tripán - estudo quantitativo.



Fonte: Autora

Figura 5: Concentrações de H₂O₂ em ordem crescente, realizado pelo ensaio de azul de Tripán - estudo qualitativo.



Fonte: Autora

Ao realizar a curva de concentração com o H₂O₂, pode-se observar que a viabilidade celular e atividade mitocondrial vão diminuindo conforme a concentração de H₂O₂ vai aumentando. Sendo esse o objetivo para induzir o estresse oxidativo. Portanto, foi escolhida a concentração de 200 µM para a continuação dos próximos experimentos, utilizando em conjunto os pré-tratamentos, pois nesta concentração ocorre a diminuição da viabilidade celular, conseqüentemente redução da atividade mitocondrial e visivelmente a população celular é diminuída, mas ainda sim tendo células viáveis.

Estudos demonstraram que o estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial, contribui para o desenvolvimento da DA. O H₂O₂ é comumente utilizado para reproduzir induzir o estresse oxidativo em células. Nossos resultados revelaram que o H₂O₂ na concentração de 200 µM ocorreu disfunção mitocondrial e a apoptose celular (YANA; WANG; ZHU, 2013; PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).

HUANG *et al.*, 2020, utilizaram o H₂O₂ como modelo de estresse oxidativo em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), as células foram estressadas com na concentração de 200 µM por 24 h. A viabilidade celular foi notavelmente reduzida em comparação com o controle, concordando com nossa curva de concentração que a dosagem ideal para que ocorra diminuição significativa na viabilidade celular seria com 200 µM.

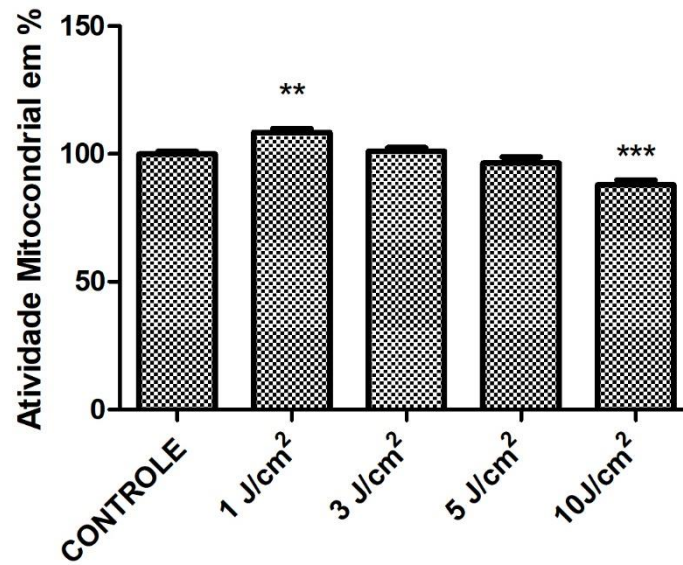
NIU *et al.*, 2018, também realizaram curva de concentração com H₂O₂ em células PC-12 e SH-SY5Y, colocando diversas concentrações de 50 µM a 300 µM. Eles escolheram trabalhar com a concentração de 200 µM em ambas as linhagens celulares para os próximos experimentos, afirmando que essa concentração foi a que induziu melhor o estresse oxidativo *in vitro*.

As imagens 4 e 5 mostram que a concentração de 200 µM não matou 100% das células, porém levou a uma redução significativa na população celular, resultante do estresse oxidativo induzido. Portanto, padronizou-se esta concentração de 200 µM de H₂O₂ como agente estressor, em incubação por 24 h como modelo de estresse oxidativo para os próximos ensaios.

7.1.2 Densidades de energia

Para verificar a atividade mitocondrial, as células foram irradiadas com LED em 660 nm com diferentes DE, objetivando encontrar a densidade ótima de energia a ser aplicada. Os dados estão dispostos em ordem crescente, e foram obtidos 24 h após a irradiação, sendo o primeiro grupo controle (sem irradiação), em seguida as demais DE de 1 J/cm² a 10 J/cm². O grupo de 1 J/cm² apresentou aumento significativo na atividade mitocondrial em relação ao grupo controle, obtendo o $p < 0,01$. O grupo de 10 J/cm² obteve diminuição na atividade mitocondrial em comparação aos demais grupos, em relação ao grupo controle apresentou diferença estatística com $p < 0,001$, conforme a figura 6.

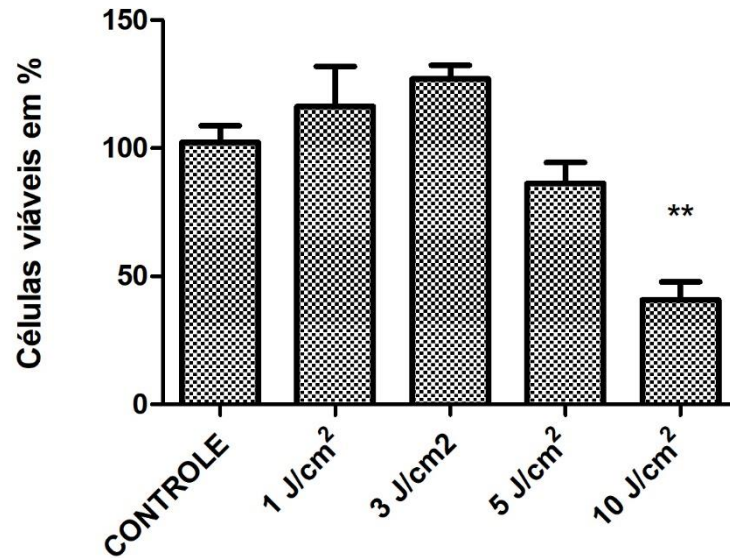
Figura 6: Atividade mitocondrial em resposta de diferentes densidades de energia do LED.



Fonte: Autora

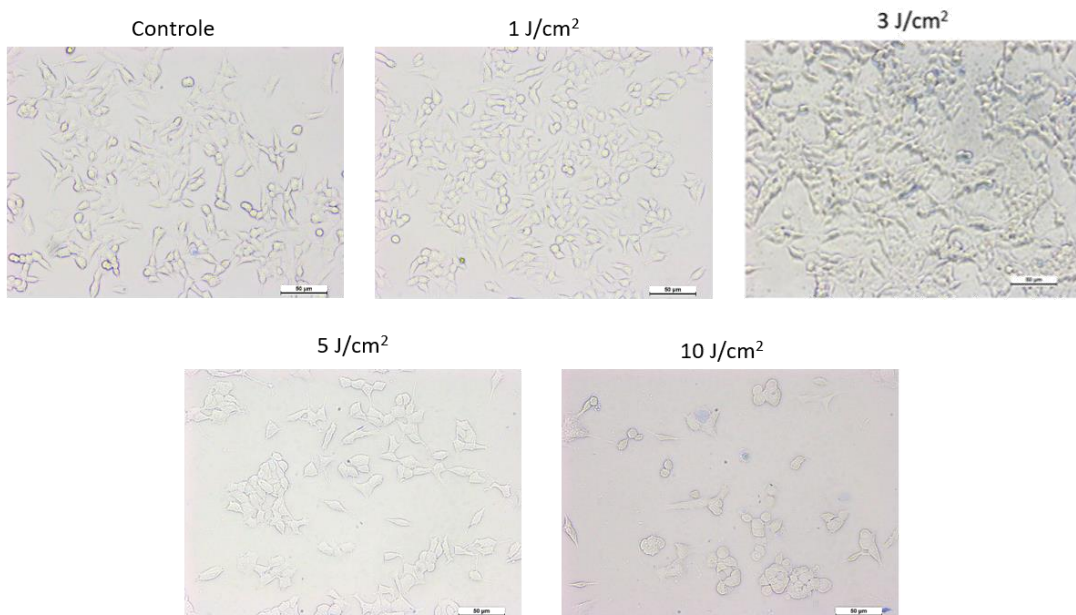
Foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando o ensaio de azul de Tripan. As células foram submetidas ao mesmo procedimento conforme descrito acima. Foi possível observar, como indica a figura 7, que a DE de 10 J/cm² diminuiu significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle, com $p < 0,001$. Já os grupos 1 J/cm² e 3 J/cm² apresentaram aumento na viabilidade celular, porém não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle. Na figura 8, é possível observar a população celular com as diferentes DE. Houve uma diminuição na população celular a partir da densidade de 5 J/cm², já nas de 1 e 3 J/cm² tiveram um aumento na população celular.

Figura 7: Diferentes densidades de energia avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo quantitativo.



Fonte: Autora

Figura 8: Diferentes DE avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo qualitativo.



Fonte: Autora

Fotobiomodulação é definida como o uso de luz monocromática ou quase monocromática de um *laser* ou LED para modificar ou modular funções biológicas (ENENGL;

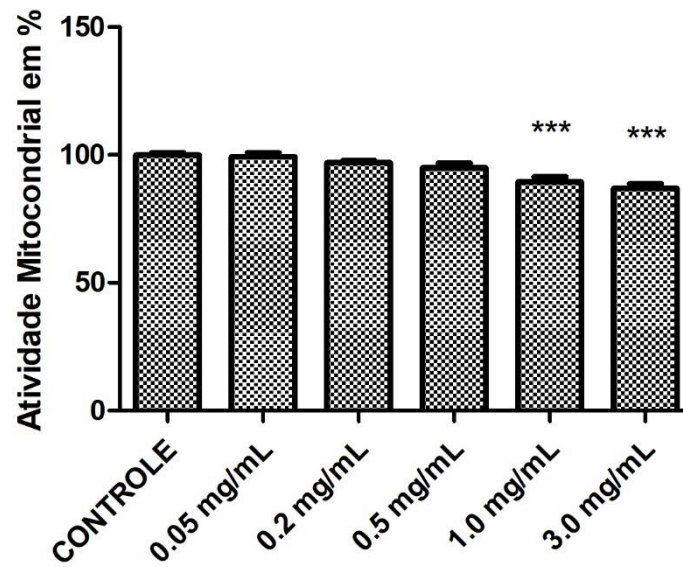
HAMBLIN; DUNGEL, 2020). Este efeito de modulação é baseado na presença de cromóforos em células e tecidos. Esses cromóforos são moléculas capazes de absorver luz, cuja excitação pode influenciar outras moléculas e vias bioquímicas com potencial de exercer um efeito terapêutico (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013)

Em nosso estudo, utilizamos o LED no comprimento de onda em 660 nm, no espectro visível (luz vermelha) em diversas DE, 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² e 10 J/cm² sendo realizado a interação da luz somente com a célula e posteriormente com a indução do estresse oxidativo. Para a comparação dos resultados, foram feitos testes de MTT que verifica a atividade mitocondrial e ensaio de viabilidade celular feito com azul de Tripán para verificar a integridade de membrana das células. Na figura 6 podemos observar que a DE de 1 J/cm² teve um maior aumento na atividade mitocondrial em relação ao grupo controle, o grupo de 3 J/cm² e 5 J/cm² não houve diferença estatística em relação ao grupo controle, já no grupo de 10 J/cm², nota-se que houve uma redução na atividade mitocondrial comparando com o grupo controle. Nas figuras 7 e 8 foi realizado o teste de azul de Tripán para verificar a viabilidade celular. A DE de 10 J/cm² houve uma redução significativa na população celular comparado ao grupo controle, já as demais DE não houve queda significativa na viabilidade celular, preservando a integridade de membrana.

7.1.3 Concentrações de taurina

Para verificar a atividade mitocondrial, as células foram expostas a diferentes concentrações de taurina em ordem crescente, com o objetivo de encontrar a dosagem ótima a ser aplicada na célula, que não acarretasse perda da viabilidade, conforme a figura 9. A partir da concentração de 1 mg/mL ocorre uma diminuição na atividade mitocondrial, tendo diferença estatística em relação ao grupo controle, com $p < 0,001$.

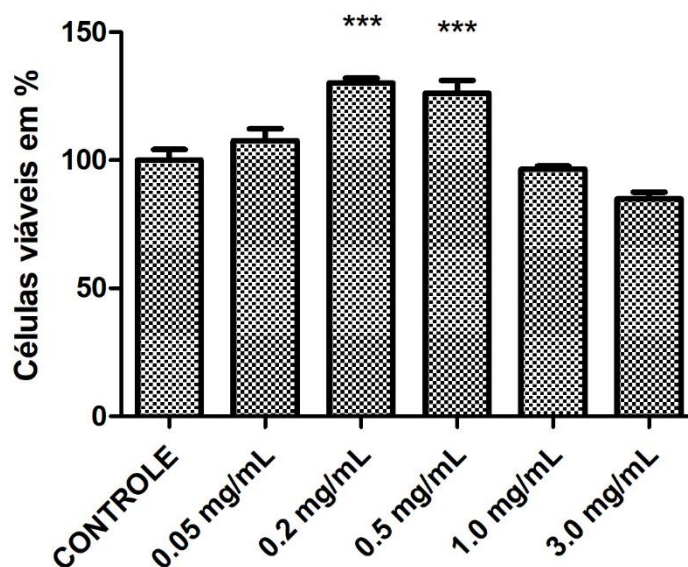
Figura 9: Ensaio de atividade mitocondrial com concentrações crescentes de taurina.



Fonte: Autora

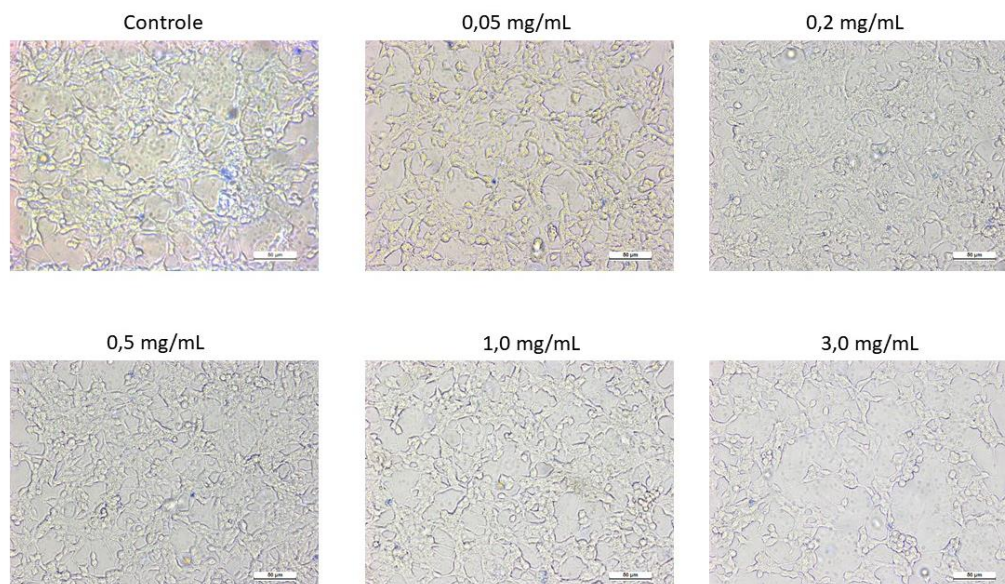
Também foi realizado o ensaio de azul de Tripán para observar a viabilidade celular. Foram adicionadas doses crescentes de taurina, no período de 24 h, em contato com as células. Na figura 10, as concentrações de 0,2 e 0,5 mg/mL aumentaram a viabilidade celular em relação ao grupo controle, com $p < 0,001$. Observando a figura 11, as concentrações de 1,0 e 3,0 mg/mL têm uma diminuição na população celular quando comparados ao grupo controle.

Figura 10: Concentrações de taurina dispostas em ordem crescente avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo quantitativo.



Fonte: Autora

Figura 11: Concentrações de taurina dispostas em ordem crescente avaliada pelo ensaio de viabilidade celular azul de Tripán – estudo qualitativo.



Fonte: Autora

É possível observar o efeito da taurina somente com as células nos testes de MTT para verificar a atividade mitocondrial e a viabilidade celular pelo teste de azul de Tripán. A taurina não causou nenhum dano às células, não apresentou efeito de toxicidade nas concentrações submetidas (0,05 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 3 mg/mL). No teste de

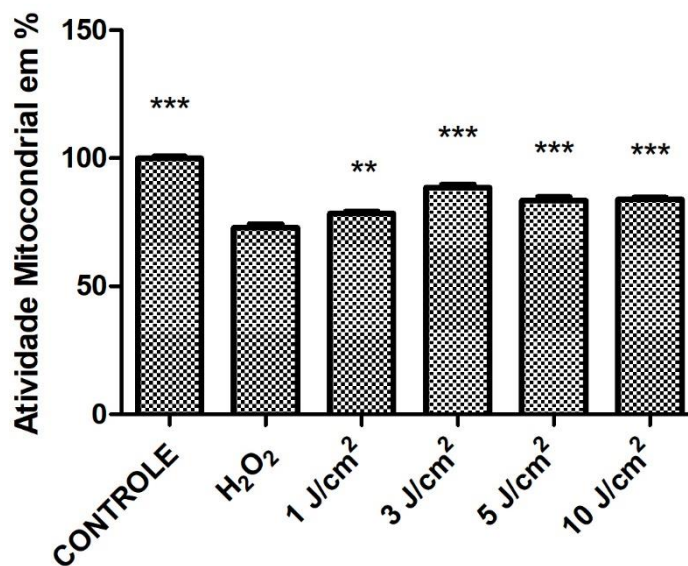
viabilidade celular é possível observar aumento populacional nas concentrações de 0,2 e 0,5 mg/mL.

7.2 AVALIAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS

7.2.1 Pré-tratamento com LED

Para avaliar o efeito do LED em ação neuroprotetora, as células foram irradiadas nas densidades de energia de 1 a 10 J/cm² e incubadas por 24 h, sendo posteriormente estressadas na concentração de 200 µM de H₂O₂, dosagem já determinada nos experimentos anteriores (figuras 3, 4 e 5), e incubadas por mais 24 h. Avaliando o pré-tratamento realizado, nota-se que todas as densidades de energia apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo estresse (H₂O₂), tendo o efeito de neuroproteção. Foi escolhida a DE de 3 J/cm² para a continuação dos próximos experimentos, pois essa energia mostrou-se mais eficaz no efeito neuroprotetor celular.

Figura 12: Ensaio de atividade mitocondrial para avaliar o pré-tratamento com LED.



Fonte: Autora

Sommer *et al.*, (2012) relataram que a fotobiomodulação reduziu os agregados β A em células de neuroblastoma humano e observaram uma redução no estresse oxidativo induzido por β A e nas respostas inflamatórias em astrócitos corticais primários de ratos.

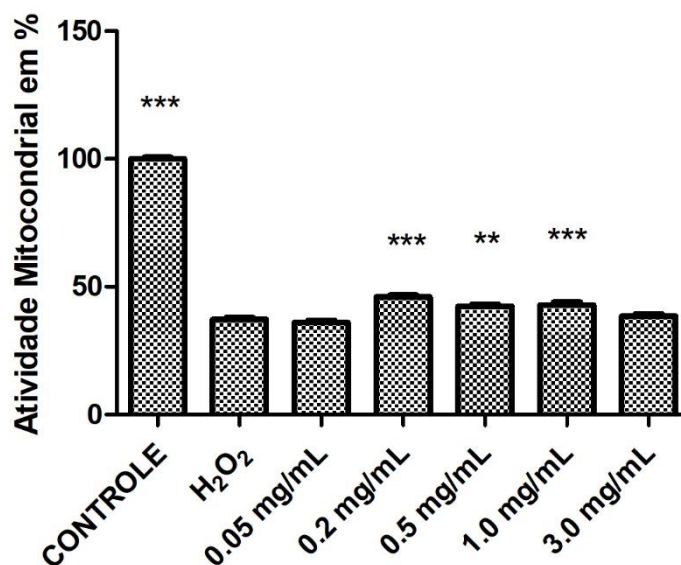
Zhang, Wu e Xing (2012) relataram especificamente que a proteína quinase B foi ativada por fotobiomodulação a uma DE de 2 J/cm², que por sua vez promoveu uma série de efeitos antiapoptóticos. De uma maneira geral densidades de energia entre 0,5 J/cm² a 4 J/cm² aplicadas a células neurais humanas possuem efeitos antiapoptóticos, proliferativos e são capazes de reduzir espécies reativas de oxigênio (ENENGL; HAMBLIN; DUNGEL, 2020).

No resultado obtido no teste de MTT, foi observado que a DE de 3 J/cm² sob estresse oxidativo ocorreu aumento significativo na atividade mitocondrial em relação ao grupo H₂O₂, sendo escolhida essa DE para a realização de outros experimentos, pois este resultado mostra que realmente ao passar a DE de 4 J/cm² os efeitos neuroprotetores e proliferativos são perdidos e passam a ser inversos, conforme a literatura demonstra (ENENGL; HAMBLIN; DUNGEL, 2020).

7.2.2 *Pré-tratamento com taurina*

Para avaliar qual a melhor dosagem de taurina para ser utilizada, foi feita a avaliação da atividade mitocondrial. As células foram submetidas as diversas concentrações de taurina: 0,05 a 3,0 mg/mL. Posteriormente, submetendo as células em estresse na concentração de 200 µM de H₂O₂ por 24 h. Pode-se observar, na figura 13, que as concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 mg/mL tiveram um aumento significativo na atividade mitocondrial em relação ao grupo H₂O₂. Foi escolhida a concentração de 0,5 mg/mL para a continuação dos experimentos, pois em experimentos realizados anteriormente com taurina, mostrou-se capaz de preservar a célula contra danos oxidativos provenientes da hidrocortisona em altas concentrações (ROSSATO *et al.*, 2021).

Figura 13: Ensaio de atividade mitocondrial para avaliar o pré-tratamento com taurina.



Fonte: Autora

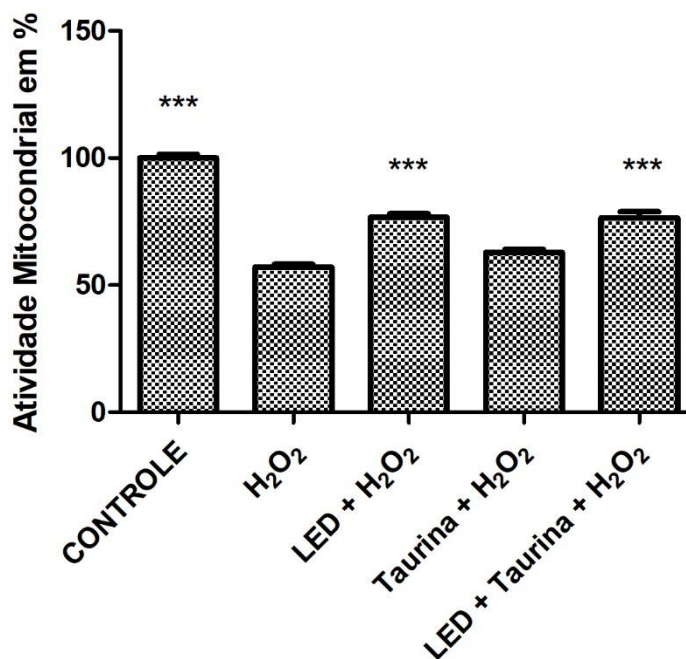
A ação citoprotetora da taurina é reafirmada, segundo (CHE *et al.*, 2018), o que leva à melhora metabólica da célula neural, além de auxiliar no desenvolvimento do DNA e prevenir a apoptose celular. Isso ocorre, segundo (LEE *et al.*, 2020) devido à capacidade da taurina de facilitar a permeabilidade celular, prevenindo assim a formação e danos decorrentes de ERO, além de funcionar como um tampão que mantém o pH do meio e captura íons eletricamente viáveis.

7.3 AVALIAÇÃO DO LED E TAURINA EM CONJUNTO EM CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO E TRATAMENTO

7.3.1 Pré-tratamento com LED e taurina sob efeito do H₂O₂

Para avaliar o efeito do LED e taurina em conjunto, as células foram irradiadas na DE de 3 J/cm², logo em seguida adicionou-se taurina na concentração de 0,5 mg/mL e foram incubadas por 24 h. Posteriormente, foram estressadas na concentração de 200 µM de H₂O₂, dosagens já determinadas nos experimentos anteriores e incubadas por mais 24 h. Avaliando o pré-tratamento, foi feita a comparação com o grupo H₂O₂, sendo assim, o grupo LED + H₂O₂ e o grupo LED + taurina + H₂O₂ apresentaram aumento significativo na atividade mitocondrial em comparação com o grupo H₂O₂, sendo $p < 0,001$.

Figura 14: Pré-tratamento realizado com LED e taurina sob efeito do H_2O_2 avaliado pelo ensaio atividade mitocondrial.



Fonte: Autora

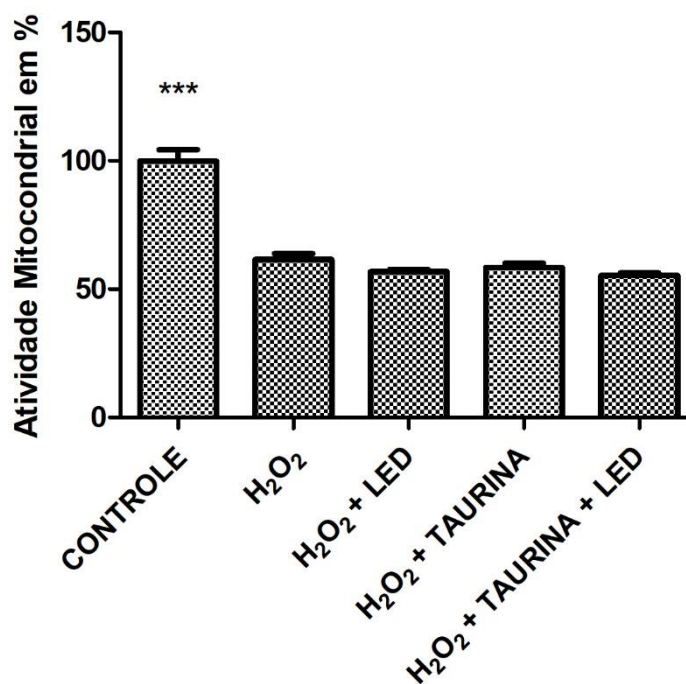
Após comparar os potenciais neuroprotetores do LED e taurina isoladamente, realizou-se a junção dos mesmos para verificar se há potencialização de preservação celular. A princípio realizou-se o modelo de pré-tratamento, ou seja, as células foram expostas ao LED e taurina simultaneamente, e depois de 24 h, foram estressadas com H_2O_2 . É possível observar que o LED ($3 J/cm^2$) desempenhou o papel de neuroproteção mais eficaz em comparação com a taurina ($0,5 mg/mL$). O grupo LED + H_2O_2 obteve diferença estatística comparado ao grupo H_2O_2 , havendo aumento na atividade mitocondrial, enquanto o grupo taurina + H_2O_2 , não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo H_2O_2 . Juntando os dois pré-tratamentos (grupo LED + taurina + H_2O_2) nota-se que há efeito neuroprotetor, comparando com o grupo H_2O_2 , apresentando diferença estatística entre eles.

7.3.2 Tratamento com LED e taurina sob efeito do H_2O_2

Neste experimento, foi avaliado o efeito de tratamento com LED e taurina em associação. Portanto, primeiramente as células foram submetidas ao estresse oxidativo com o H_2O_2 na concentração de $200 \mu M$ e incubadas por 24 h. Após esse período, foram irradiadas com LED na DE de $3 J/cm^2$ e com adição de taurina na concentração de $0,5 mg/mL$. Avaliando o tratamento, foi feita a comparação com o grupo H_2O_2 , sendo assim, o grupo LED + H_2O_2 ,

taurina + H₂O₂ e o grupo LED + taurina + H₂O₂ não apresentaram aumento significativo na atividade mitocondrial em comparação com o grupo H₂O₂.

Figura 15: Tratamento realizado com LED e taurina sob efeito do H₂O₂ avaliados pelo ensaio de atividade mitocondrial.



Fonte: Autora

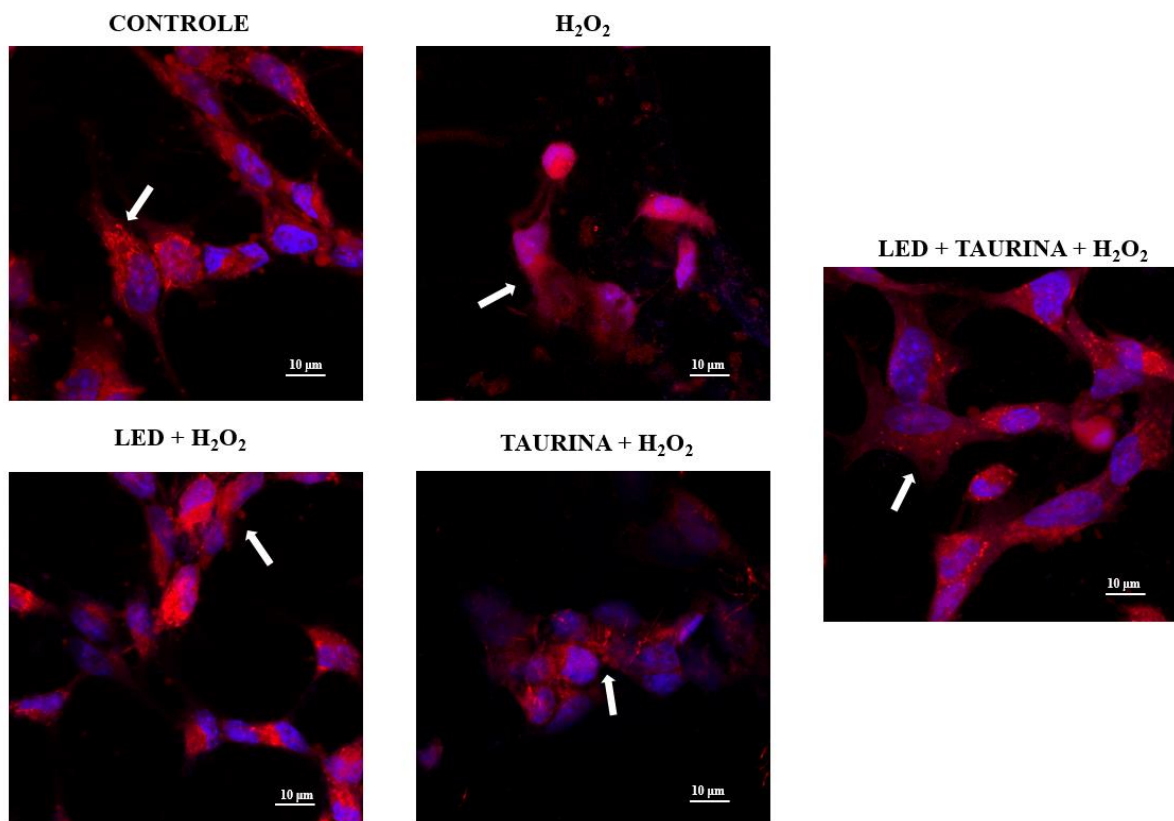
Foi comprovado por meio do teste de MTT a potencialidade neuroprotetora do LED e taurina. Porém, também foi avaliado se o LED e taurina em conjunto possuem efeito de reparação celular, ou seja, primeiramente as células foram estressadas oxidativamente pelo H₂O₂ e 24 h depois foram tratadas com LED e taurina. Nota-se que tanto o LED quanto a taurina não possuíram efeitos restauradores. Portanto, para a continuação dos experimentos foi escolhido o modelo de pré-tratamento, onde o LED mostrou-se mais eficaz na proteção de células neurais.

7.4 AVALIAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS NO PRÉ-TRATAMENTO POR FLUORESCÊNCIA

A microscopia de fluorescência realizada com *MitoTracker Orange* cora as mitocôndrias em células vivas. As imagens foram obtidas por meio do microscópio confocal, é possível verificar visualmente o efeito neuroprotetor. Portanto, neste experimento foi realizado o pré-tratamento utilizando LED (3 J/cm²) e taurina (0,5 mg/mL) e posteriormente adicionado

o H_2O_2 (200 μM), afim de promover o estresse oxidativo. Os grupos analisados foram: Controle; H_2O_2 ; LED + H_2O_2 ; taurina + H_2O_2 ; LED + taurina + H_2O_2 . Observando a figura 16, a célula após a exposição do H_2O_2 mostrou baixa emissão de fluorescência de *MitoTracker* e também ocorre fragmentação mitocondrial, sendo consequência de alta produção de EROs. No entanto, no pré-tratamento realizado com LED + taurina pode-se observar que as mitocôndrias já estão mais ordenadas em comparação com o grupo H_2O_2 .

Figura 16: Avaliação das mitocôndrias por meio da marcação de fluorescência realizado no pré-tratamento com LED e taurina sob efeito do H_2O_2 .



Fonte: Autora

O estresse oxidativo excessivo ocorre danos às células, podendo desencadear morte por necrose ou apoptose. As mitocôndrias são o principal local de produção de ERO e o excesso pode danificá-las (WAI; LANGER, 2016). As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em células eucarióticas, sendo responsáveis pela grande maioria da produção de energia para a produção de ATP (Adenosina Trifosfato). Estudos relatam que a disfunção mitocondrial está associada ao estresse oxidativo, que contribui para anormalidades estruturais, perda das sinapses e degeneração celular (GRIMM *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2018).

A manutenção da função mitocondrial é necessária filologicamente, especialmente quando é exposta a agentes estressores químicos ou físicos. As mitocôndrias desempenham um papel fundamental tanto no desencadeamento quanto na sustentação da via apoptótica. Sendo assim, quando expostas a algum tipo de tóxico, podem apresentar comprometimento nas organelas, alterações morfológicas e a dinâmica mitocondrial prejudicada (GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2014; DE OLIVEIRA; BRASIL; FÜRSTENAU, 2018)

A marcação de fluorescência com *MitoTracker Orange* é altamente receptiva ao potencial de membrana mitocondrial e é considerada um indicador para a verificação de estresse oxidativo presente nas mitocôndrias (TOMKOVA *et al.*, 2018). No experimento realizado com o pré-tratamento utilizando LED e taurina sob a ação do H_2O_2 , podemos observar que no grupo controle apresenta as mitocôndrias de maneira ordenada e a emissão de fluorescência visualmente é mais intensa ao se comparar com o grupo H_2O_2 . O H_2O_2 ocasionou fragmentos nas mitocôndrias, segundo Kesari *et al.* (2020) a menor fluorescência do *MitoTracker* resulta na produção de ERO e pode ser reconhecida como o ensaio confiável para examinar o estresse oxidativo mesmo com ERO em baixo nível formados nas mitocôndrias. O grupo LED + taurina + H_2O_2 , que é o pré-tratamento, aliviou a fragmentação das mitocôndrias sendo observado que boa parte delas continuam íntegras. De acordo com os estudos de KANG *et al.* (2020) as atividades mitocondriais celular, produção de ATP, potencial de membrana mitocondrial e respiração mitocondrial foram restaurados aos níveis normais utilizando a quercetina como pré-tratamento.

7.5 AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO MEV

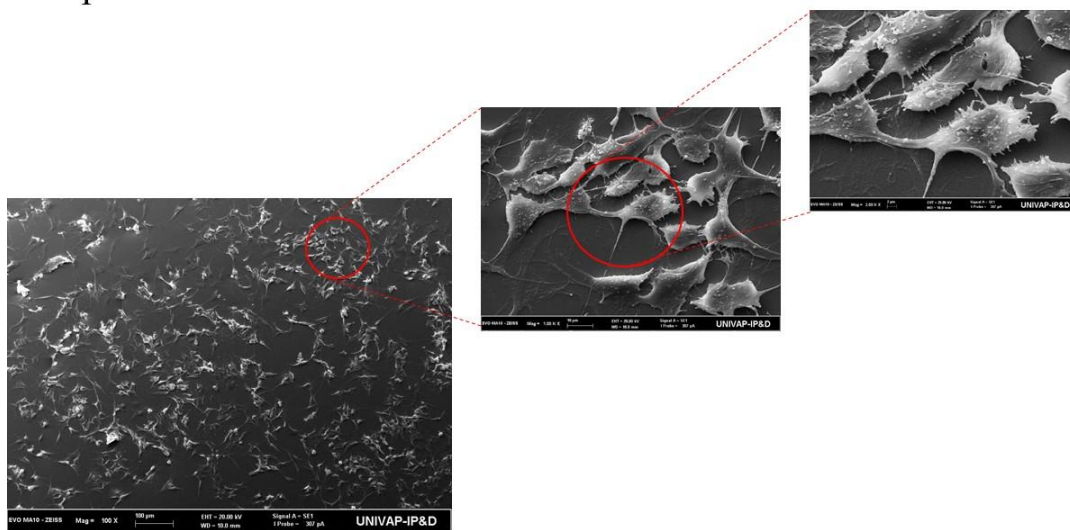
O objetivo do uso da técnica é verificar a morfologia das células, analisando o efeito da neuroproteção do LED e taurina na linhagem celular SH-SY5Y. Deste modo produzindo imagens de alta resolução da superfície da amostra. Além disso, pode ser verificado também que as imagens têm uma aparência tridimensional característica e são úteis para avaliar a estrutura superficial, bem como a diferenças entre cada grupo estudado (LIAW; ZHANG; KANNAN, 2019).

As imagens foram obtidas com aumento de 100x mostrando em maior campo a população celular, aumento de 1000x focando na morfologia da célula e aumento de 2000x para avaliar a estrutura celular dos grupos Controle; H_2O_2 ; LED + H_2O_2 ; taurina + H_2O_2 ; LED + taurina + H_2O_2 , figuras 17, 18, 19, 20 e 21 respectivamente. Pode-se observar que o grupo H_2O_2

obteve diminuição na população celular e retração dos prolongamentos em comparação com o grupo controle, assim perdendo a comunicação entre as células, sendo característica da DA. No grupo LED + taurina + H_2O_2 percebe-se uma melhora nas características celulares em relação ao grupo H_2O_2 , preservando os prolongamentos característicos de uma célula saudável.

Figura 17: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo controle nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.

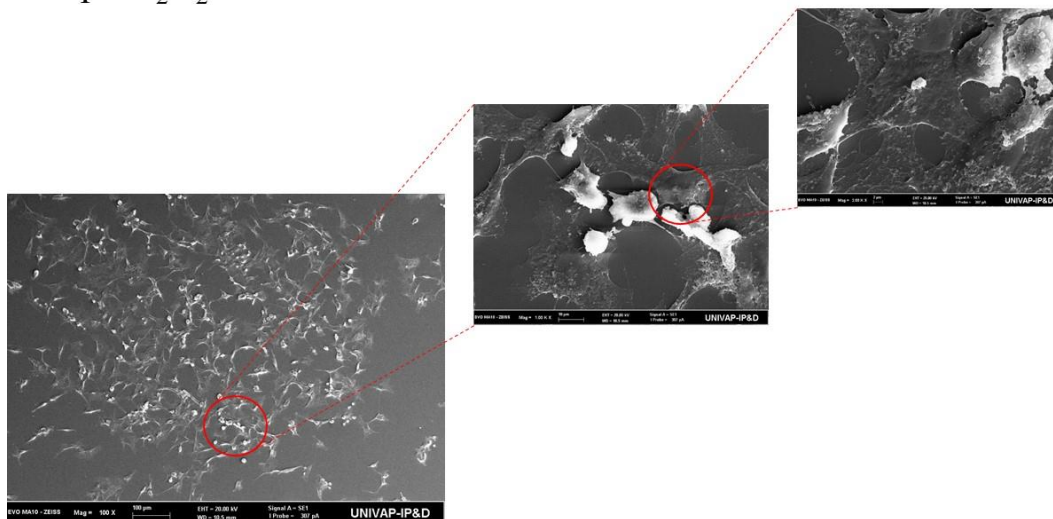
Grupo Controle



Fonte: Autora

Figura 18: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo H_2O_2 nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.

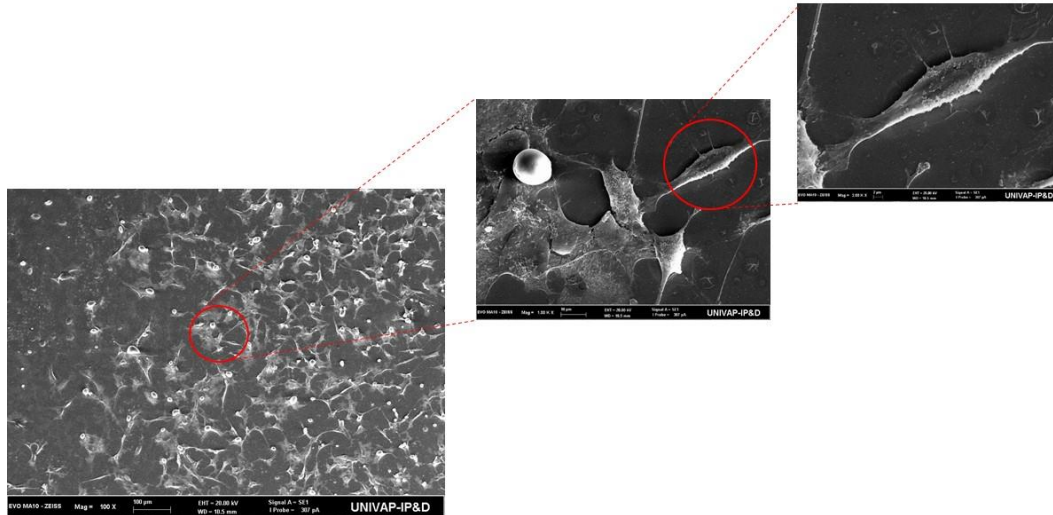
Grupo H_2O_2



Fonte: Autora

Figura 19: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo LED + H₂O₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.

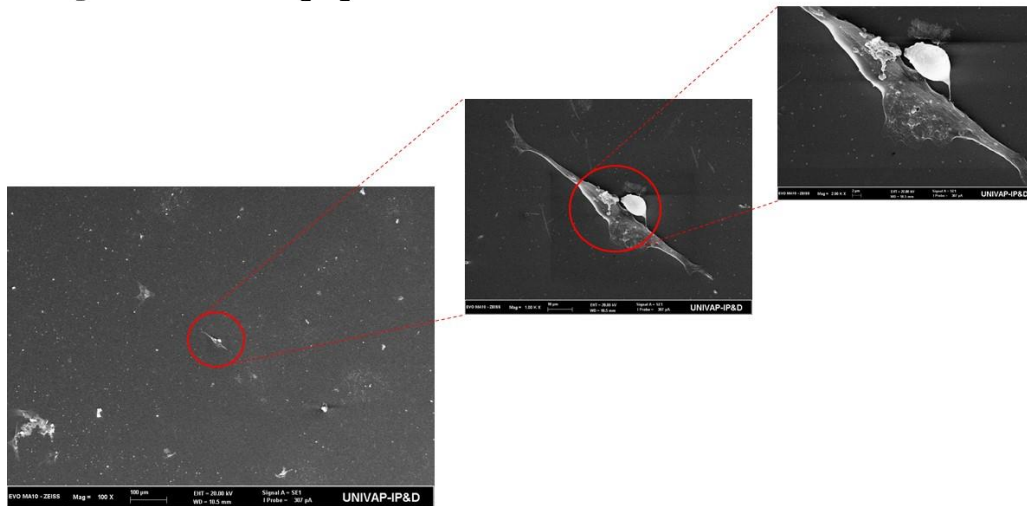
Grupo LED + H₂O₂



Fonte: Autora

Figura 20: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo taurina + H₂O₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.

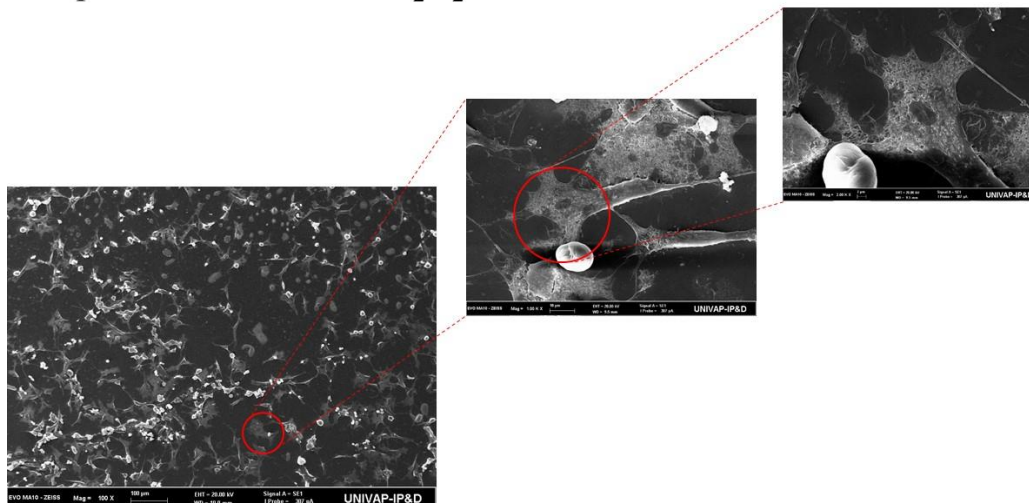
Grupo Taurina + H₂O₂



Fonte: Autora

Figura 21: Análise das micrografias obtidas pelo MEV no grupo LED + taurina + H₂O₂ nos aumentos de 100x, 1000x e 2000x, respectivamente.

Grupo LED + Taurina + H₂O₂



Fonte: Autora

Confirmou-se morfologicamente o efeito neuroprotetor do LED em conjunto com a taurina perante os resultados de viabilidade celular e atividade mitocondrial por MEV, observando-se por foto micrografias as características e o comportamento morfológico de cada célula. As imagens foram obtidas com aumento de 100x mostrando em maior campo a população celular, aumento de 1000x focando na morfologia da célula e aumento de 2000x para avaliar a estrutura celular dos grupos Controle; H₂O₂; LED + H₂O₂; taurina + H₂O₂; LED + taurina + H₂O₂, figuras 17, 18, 19, 20 e 21 respectivamente.

Comparando o grupo controle e H₂O₂, podemos observar a modificação da morfologia celular, no grupo estresse, em relação ao grupo controle, houve modificação estrutural celular, retraindo os prolongamentos característicos de célula neural e uma diminuição na população celular. Comparando os dois pré-tratamentos LED + H₂O₂ e taurina + H₂O₂, pode-se observar que o LED teve maior efeito neuroprotetor em relação a taurina. Nota-se que a taurina possivelmente em conjunto com o H₂O₂, potencializou a morte celular, como mostra a figura 20, ocorreu uma diminuição significativa na população celular e a estrutura está comprometida. Já no grupo LED + taurina + H₂O₂ em comparação ao grupo H₂O₂, obteve preservação na morfologia celular, mantendo as projeções estelares ramificações das células e maior número de população celular. Deste modo confirmando os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular por azul de Tripán, visto que foi verificado comportamento semelhante na quantidade populacional celular.

Para compreender melhor essas alterações estruturais, (INELIA MORALES; GONZALO FAÑAS; RICARDO, 2010) afirmou que o estresse oxidativo é causado por um grande número de ERO, sendo altamente prejudicial quando produzidos em excesso em nosso organismo, podendo levar alterações estruturais nas proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando à morte celular.

O depósito de proteína β A, frutos da hiperfosforilação da proteína *TAU*, desenvolve uma alteração da fisiologia neural, principalmente nas sinapses, levando a um comprometimento celular e morte (KALAGATUR *et al.*, 2021). Em concordância, (MONTEIRO; KANDRATAVICIUS; LEITE, 2011) mostram que essa hiperfosforilação da proteína *TAU* resulta em sua deposição nos filamentos celulares, sendo responsável no processo de neurodegeneração que ocorre na DA.

Por meio das imagens obtidas por MEV pode-se comprovar morfológicamente o comportamento das células pré-tratadas com LED e taurina, estressadas oxidativamente. Assim, concordando com os resultados obtidos pelos testes de MTT e azul de tripan. O LED, visualmente, apresentou melhoras nas características morfológicas das células e obteve efeito neuroprotetor em todos os grupos que continham o H_2O_2 .

8 CONCLUSÃO

Foi possível determinar a concentração ideal de H_2O_2 capaz de estimular o estresse oxidativo característico da DA, para a linhagem de neuroblastoma humano. Estabeleceu-se, também, a concentração ideal de taurina que promove efeito antioxidante e foi possível determinar a DE com LED para promover a fotobiomodulação celular, sendo assim, ambas responsáveis por aumentar a viabilidade celular. Pioneiramente, este estudo aborda os efeitos neuroprotetores da taurina e do LED em um modelo *in vitro* da DA, abordando novos conceitos e novas possibilidades de prevenção. Ao utilizar a taurina e a irradiação com LED como tratamento, ou seja, após o estresse celular realizado com o H_2O_2 , pode-se perceber que não houve melhora na viabilidade celular. Comparando os dois pré-tratamentos, o LED obteve maior efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo do que a taurina.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Lívea Fujita; DE MEDEIROS, Marisa HG; AUGUSTO, Ohara. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Química Nova**, v. 29, p. 1352-1360, 2006.
- CHE, Yuning *et al.* Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1 polarization. **Cell death & disease**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-0468-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0468-2>.
- MORAES, Dailton Guedes de Oliveira *et al.* Genotoxic effects of photodynamic therapy in laryngeal cancer cells – An in vitro study. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 244, n. 3, p. 262–271, 2019. DOI: 10.1177/1535370219826544. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1535370219826544>.
- DE FALCO, Anna. *et al.* Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 63–80, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20150152.
- DE OLIVEIRA, Marcos Roberto; BRASIL, Flávia Bittencourt; FÜRSTENAU, Cristina Ribas. Evaluation of the Mitochondria-Related Redox and Bioenergetics Effects of Gastrodin in SH-SY5Y Cells Exposed to Hydrogen Peroxide. **Journal of Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 242–251, 2018. DOI: 10.1007/s12031-018-1027-0.
- ENENGL, Joachim; HAMBLIN, Michael R.; DUNGEL, Peter. Photobiomodulation for Alzheimer's Disease: Translating Basic Research to Clinical Application. **Journal of Alzheimer's Disease**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 1405–1416, 2020. DOI: 10.3233/JAD-191210.
- FISH, Paul V. *et al.* New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 125–133, 2019. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.11.034. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>.
- FURTADO, Cristina Moreira. *et al.* Terapia gênica recupera memória de ratos com Alzheimer : um novo passo em direção à cura. **Nanocell News**, [S. l.], v.1, n. 11, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2014.05.13.003>
- GANDHI, Sonia; ABRAMOV, Andrey Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/428010.
- GIACOBINI, Ezio; GOLD, Gabriel. Alzheimer disease therapy - Moving from amyloid- β to tau. **Nature Reviews Neurology**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 677–686, 2013. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.223.
- GRANATO, Alessandro EC *et al.* Polypyrrole increases branching and neurite extension by Neuro2A cells on PBAT ultrathin fibers. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1753–1763, 2018. DOI: 10.1016/j.nano.2018.05.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.05.004>.
- GREEN, Douglas R.; GALLUZZI, Lorenzo; KROEMER, Guido. Metabolic control of cell death. **Science**, [S. l.], v. 345, n. 6203, 2014. DOI: 10.1126/science.1250256.

GRIMM, Amandine *et al.* Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: An ambiguous relationship. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 151–160, 2012. DOI: 10.1007/s12035-012-8281-x.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.

HAMBLIN, Michael R. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: Has the light dawned? **Photonics**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 1–27, 2019. DOI: 10.3390/PHOTONICS6030077.

HUANG, Bingxu *et al.* α -Cyperone Attenuates H₂O₂-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SH-SY5Y Cells via Activation of Nrf2. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. April, p. 1–10, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00281.

INELIA MORALES, G.; GONZALO FÁÑAS, G.; RICARDO, B. La neuroinfamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 49–57, 2010. DOI: 10.4067/s0717-92272010000200007.

JANG, Ji Yong *et al.* The role of mitochondria in aging. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 128, n. 9, p. 3662–3670, 2018. DOI: 10.1172/JCI120842.

KALAGATUR, Naveen Kumar *et al.* Quercetin mitigates the deoxynivalenol mycotoxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells by modulating the oxidative stress mediators. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 465–477, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.030. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.030>.

KANG, Sora *et al.* Qi-activating quercetin alleviates mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in vivo and in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 553–566, 2020. DOI: 10.1007/s12272-020-01238-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01238-x>.

KESARI, Kavindra Kumar *et al.* Plant-derived natural biomolecule picein attenuates menadione induced oxidative stress on neuroblastoma cell mitochondria. **Antioxidants**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3390/antiox9060552.

KUMARI, Neeta; PRENTICE, Howard; WU, Jang Yen. Taurine and its neuroprotective role. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 775, p. 19–27, 2013. DOI: 10.1007/978-1-4614-6130-2_2.

LEE, Won Jin *et al.* Taurine and Ginsenoside Rf Induce BDNF Expression in SH-SY5Y Cells: A Potential Role of BDNF in Corticosterone-Triggered Cellular Damage. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 12, 2020. DOI: 10.3390/molecules25122819.

LIAW, Kevin; ZHANG, Zhi; KANNAN, Sujatha. Neuronanotechnology for brain regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 148, p. 3–18, 2019. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.004>.

LUCIANA, Marina *et al.* Fatores que influenciam na qualidade de vida de idosos com doença de alzheimer. [S. l.], n. Oct. 2019, p. 530–543, 2017. DOI: 10.18677/EnciBio.

MARCINKIEWICZ, Janusz; KONTNY, Ewa. Taurine and inflammatory diseases. **Amino Acids**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 7–20, 2014. DOI: 10.1007/s00726-012-1361-4.

MARTINS, Fernanda *et al.* Evaluation of the Neurotoxic / Neuroprotective Role of Organoselenides Using Differentiated Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line Challenged with 6-Hydroxydopamine. *[S. l.]*, p. 138–149, 2012. DOI: 10.1007/s12640-012-9311-1.

MENG, Chengbo; HE, Zhiyong; XING, Da. Low-level laser therapy rescues dendrite atrophy via upregulating BDNF expression: Implications for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, *[S. l.]*, v. 33, n. 33, p. 13505–13517, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0918-13.2013.

MENZIE, Janet; PAN, Chunliu; PRENTICE, Howard; WU, Jang Yen. Taurine and central nervous system disorders. **Amino Acids**, *[S. l.]*, v. 46, n. 1, p. 31–46, 2014. DOI: 10.1007/s00726-012-1382-z.

MESTER, Adam; MESTER, Andrew. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). **Photomedicine and Laser Surgery**, *[S. l.]*, v. 35, n. 8, p. 393–394, 2017. DOI: 10.1089/pho.2017.4332.

LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006

MONTEIRO, Mariana Raquel; KANDRATAVICIUS, Ludmyla; LEITE, João Pereira. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, *[S. l.]*, v. 17, n. 1, p. 17–23, 2011. DOI: 10.1590/s1676-26492011000100005.

MOSKVIN, Sergey Vladimirovich. Only lasers can be used for low level laser therapy. **BioMedicine (France)**, *[S. l.]*, v. 7, n. 4, p. 4–11, 2017. DOI: 10.1051/bmdcn/2017070422.

NAWASHIRO, Hiroshi *et al.* Focal increase in cerebral blood flow after treatment with near-infrared light to the forehead in a patient in a persistent vegetative state. **Photomedicine and Laser Surgery**, *[S. l.]*, v. 30, n. 4, p. 231–233, 2012. DOI: 10.1089/pho.2011.3044.

NIU, Tong *et al.* *et al.* Lycium Barbarum Polysaccharides Alleviates Oxidative Damage Induced by H₂O₂ Through Down-Regulating MicroRNA-194 in PC-12 and SH-SY5Y Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 50, n. 2, p. 460–472, 2018. DOI: 10.1159/000494159.

PUSPITA, Lesly; CHUNG, Sun Young; SHIM, Jae Won. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, *[S. l.]*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1186/s13041-017-0340-9.

RABELO, Thallita Kelly. **Caracterização redox-ativa do ácido úsnico e seu efeito citotóxico em células SH-SY5Y**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.

REITZ, Christiane; MAYEUX, Richard. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochemical Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 88, n. 4, p. 640–651, 2014. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.

ROJAS, Julio C.; BRUCHEY, Aleksandra K.; GONZALEZ-LIMA, Francisco. Low-level light therapy improves cortical metabolic capacity and memory retention. **Journal of**

Alzheimer's Disease, [*S. l.*], v. 32, n. 3, p. 741–752, 2012. DOI: 10.3233/JAD-2012-120817.

ROJAS, Julio C.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. **Biochemical Pharmacology**, [*S. l.*], v. 86, n. 4, p. 447–457, 2013. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.06.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.06.012>.

ROSSATO, Rafaella Carvalho *et al.* Efeitos neuroprotetores da hidrocortisona em linhagem de neuroblastoma de murino (neuro-2a) sob estresse oxidativo. *Revista Univap*, v. 26, n. 52, p. 93-106, 2020..

ROSSATO, Rafaella Carvalho. *et al.*. Neuroprotective effects of taurine on SH-SY5Y cells under hydrocortisone induced stress. **Research, Society and Development**, [*S. l.*], v. 10, n. 9, p. e55510918426, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.18426.

SALAMEH, Therese S. *et al.* Central Nervous System Delivery of Intranasal Insulin: Mechanisms of Uptake and Effects on Cognition. **Journal of Alzheimer's Disease**, [*S. l.*], v. 47, n. 3, p. 715–728, 2015. DOI: 10.3233/JAD-150307.

SALEHPOUR, Farzad. *et al.* Transcranial low-level laser therapy improves brain mitochondrial function and cognitive impairment in D-galactose–induced aging mice. **Neurobiology of Aging**, [*S. l.*], v. 58, p. 140–150, 2017. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.025>.

SALLES, Geisa Nogueira. *el al.*. A Novel Bioresorbable Device as a Controlled Release System for Protecting Cells from Oxidative Stress from Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, [*S. l.*], v. 54, n. 9, p. 6827–6838, 2017. DOI: 10.1007/s12035-016-0200-0.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria**, [*S. l.*], v. 30, n. 1, p. 0–0, 2008. DOI: 10.1590/S0101-81082008000200002. Disponível em: <http://www.cienciasecognicao.org/revista/index.php/ecc/article/viewFile/833/539>.

SOMMER, Andrei P. *et al.* 670 nm laser light and EGCG complementarily reduce amyloid- β aggregates in human neuroblastoma cells: Basis for treatment of alzheimer's disease? **Photomedicine and Laser Surgery**, [*S. l.*], v. 30, n. 1, p. 54–60, 2012. DOI: 10.1089/pho.2011.3073.

SUTHERLAND, John C. Biological Effects of Polychromatic Light¶. **Photochemistry and Photobiology**, [*S. l.*], v. 76, n. 2, p. 164, 2002. DOI: 10.1562/0031-8655(2002)076<0164:beopl>2.0.co;2.

TEIXEIRA, D. Aquino Oliveira; NICÉIA, Ilka; ELENA, Maria. *Biologia do envelhecimento : teorias , mecanismos e perspectivas* *Biology of aging : theories , mechanisms , and perspectives*. [*S. l.*], 2010.

TOMKOVA, Silvia. *et al.* In vitro identification of mitochondrial oxidative stress production by time-resolved fluorescence imaging of glioma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [*S. l.*], v. 1865, n. 4, p. 616–628, 2018. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.01.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.012>.

UELAND, Per Magne. Choline and betaine in health and disease. **Journal of Inherited**

Metabolic Disease, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 3–15, 2011. DOI: 10.1007/s10545-010-9088-4.

WAI, Timothy; LANGER, Thomas. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 105–117, 2016. DOI: 10.1016/j.tem.2015.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>.

WÓJCIK, Oktawia P. *et al.* The potential protective effects of taurine on coronary heart disease. **Atherosclerosis**, [S. l.], v. 208, n. 1, p. 19–25, 2010. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.002.

WU, Jang-yen; PRENTICE, Howard. Multi-Faceted Role of Taurine in the Central Nervous System. **Adaptive Medicine**, [S. l.], v. 17, n. Suppl 1, p. 2–7, 2013. DOI: 10.4247/am.2013.abc047.

XUN, Zhiyin. *et al.* Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, [S. l.], v. 133, n. 4, p. 176–185, 2012. DOI: 10.1016/j.mad.2012.01.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2012.01.008>.

YAMORI, Yukio. *et al.* Taurine in health and diseases: Consistent evidence from experimental and epidemiological studies. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 17, n. SUPPL. 1, p. 1–14, 2010. DOI: 10.1186/1423-0127-17-S1-S6.

YANA, Michael H.; WANG, Xinglong; ZHU, Xiongwei. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 62, p. 90–101, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014>.

ZHANG, Heng; WU, Shengnan; XING, Da. Inhibition of A β 25–35-induced cell apoptosis by low-power-laser-irradiation (LPLI) through promoting Akt-dependent YAP cytoplasmic translocation. **Cellular signalling**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 224–232, 2012.

ZHANG, Xiuli *et al.* Effects of taurine on alterations of neurobehavior and neurodevelopment key proteins expression in infant rats by exposure to hexabromocyclododecane. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 975, n. 9, p. 119–130, 2017. DOI: 10.1007/978-94-024-1079-2_11.