

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GUILHERME RABELO NASUK**

**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE  
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUVEC  
SUBMETIDAS À HIPÓXIA**

**São Paulo**  
**2023**

**GUILHERME RABELO NASUK**

**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE  
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUVEC  
SUBMETIDAS À HIPÓXIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Medicina –  
Ciências da Saúde da Universidade Nove de  
Julho, para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências da Saúde

**Orientador:** Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

**São Paulo**

**2023**

Nasuk, Guilherme Rabelo.

Efeito da terapia de fotobiomodulação na expressão de biomarcadores de estresse oxidativo em células HUVEC submetidas à hipóxia. / Guilherme Rabelo Nasuk. 2023.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior.

1. Fotobiomodulação. 2. HUVEC. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Estresse oxidativo.

I. Silva Júnior, José Antônio. II. Título

CDU 616

São Paulo, 19 de dezembro de 2023.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: **GUILHERME RABELO NASUK**

Título da dissertação: **EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES DE MORTE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUVEC SUBMETIDAS À HIPÓXIA.**

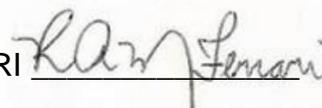
Presidente: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR



Membro: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



**Dedico este trabalho ao  
meu pai, Aparecido Nasuk,  
que hoje vive em meu coração.  
“A saudade eterna sempre  
será um sentimento que  
vou carregar, assim  
como a gratidão e  
o amor que por ti sinto”.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha querida mãe Maria Aparecida e minha adorável esposa Thais, por todo apoio e incentivo, por nunca me deixarem desistir de meus objetivos e sempre acreditar em mim.

Aos amigos que souberam entender minha ausência e mesmo assim me apoiaram.

Aos companheiros de pesquisa: Leonardo Paroche de Matos e Bruna Calixto de Jesus por toda ajuda e troca de conhecimentos que tivemos ao longo dessa jornada.

Ambos foram peças fundamentais para todo esse trabalho. E em especial ao companheiro: Allan Luís Barboza Atum que me passou muito conhecimento, ensinamentos e abriu minha visão a muitos pontos cruciais para meu desenvolvimento como pesquisador. E ao companheiro: Gabriel Almeida da Silva que foi de vital ajuda principalmente nas etapas finais desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que participaram de nossas pesquisas e contribuíram muito para nos ajudar, e tiveram grande contribuição para esse trabalho. Em especial ao aluno: Júlio Cardoso que sempre demonstrou disposição e proatividade para tudo que fosse solicitado sendo uma peça-chave para essa pesquisa.

Aos estagiários de graduação em Biomedicina que puderam acompanhar e ajudar em nossas pesquisas e demonstraram interesse e disposição.

Aos colegas de mestrado, por toda troca de conhecimentos e apoio que tivemos uns com outros sempre.

Aos técnicos de laboratório, que sempre estiveram à disposição para qualquer necessidade e/ou problema.

A todos os funcionários da Universidade Nove de Julho, pois sem eles nada disso seria possível. Agradeço a todos os setores, pois graças a eles a universidade se mantém sempre em perfeitas condições, limpa, arrumada, segura.

Por isso agradeço a secretaria, segurança, limpeza.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, por todo conhecimento passado.

Ao professor Humberto, pela ajuda em todo o processo de obtenção da bolsa de auxílio.

A Universidade Nove de Julho pela bolsa de estudos cedida, ela foi peça essencial para realizar essa pesquisa.

A CAPES pela bolsa-auxílio de pesquisa a qual foi de vital importância para aumentar ainda mais a dedicação e comprometimento com a pesquisa.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu orientador Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior, que sempre se mostrou presente e paciente para ensinar e passar todo o seu conhecimento de forma clara e objetiva, sempre soube entender qualquer dificuldade e achar o melhor método para orientar e ajudar. Eu sei que iniciei cheio de dificuldades, mas pouco a pouco fui sendo cativado pela pesquisa, tendo cada vez mais interesse e isso se deve muito ao Prof. Dr. José Antônio, por isso novamente o agradeço. Que eu possa ter a honra de passar a diante todo esse conhecimento que adquiri.

Sei que o mestrado é um grande passo, mas está longe de ser o último nessa jornada de pesquisa, comecei cheio de dúvidas, as sanei em maior parte e já tenho muitas mais dúvidas e assim sei que irei crescendo cada vez mais nessa estrada de pesquisa que tanto me cativou.

Shakespeare, em sua obra "Hamlet"  
perguntou-se em primeira instância:  
"Ser, ou não ser? Eis a questão..." Diria então a Shakespeare, que prefiro não ser!  
Prefiro apenas estar!  
E nesse estado, me fazer independe do sentido.  
Logo, não serei...  
Não tomarei para mim as dores que assolam o sentido!  
Estarei ao meu ver, covarde de ser!  
Porém, estarei intrinsecamente humano...  
E essa vã escolha, se transformará apenas numa Ilusão futura, do estado que virá...

Álvaro de Azevedo

## RESUMO

Considerado por muito tempo como camada celular inerte, o endotélio é reconhecido como um importante regulador das principais funções fisiológicas. As células endoteliais respondem a estímulos químicos e secretam fatores que modulam diversos processos fisiológicos, principalmente sob hipóxia. Essa condição pode desencadear respostas adaptativas e ter efeitos prejudiciais se persistir por períodos prolongados, causando modificações transcricionais que resultam em alterações da homeostase celular. A terapia de fotobiomodulação (FBM) pode estimular a produção de colágeno, promover a síntese de DNA e proteínas, aumentar o conteúdo de ATP, modular a migração e proliferação celular, acelera o reparo tecidual e induz a diferenciação celular. Nesse contexto, a avaliação das adaptações celulares à hipóxia pode fornecer conhecimentos para melhorar os tratamentos e reduzir essas perdas. O presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar os efeitos da FBM pré indução de hipóxia em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECS), para prevenir possíveis danos gerados pela hipóxia. A metodologia compreendeu expressão gênica e atividade proteica através de testes *in vitro*. As células foram caracterizadas pela expressão de CD31 APC e CD146 APC pelo método de citometria de fluxo. As células, mantidas em cultura, foram soltas de uma garrafa matriz de 75cm<sup>2</sup> e semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> na quantidade 1x10<sup>6</sup>. Nossos resultados evidenciaram que hipóxia apenas promoveu forte redução da viabilidade celular e que FBM com laser vermelho (660 nm; 1,5 J/cm<sup>2</sup>; 60s) pré hipóxia aumentou este parâmetro. As expressões de RNAm das enzimas antioxidantes SOD1 e CAT foram reduzidas pela hipóxia, e foram aumentadas com o uso da FBM. As atividades de SOD e GPx foram aumentadas pela FBM. A expressão de Hsp1a/b (HSP70), biomarcador de dano celular, mostrou-se aumentada pela hipóxia, sendo este efeito bloqueado pela ação da PBM, demonstrando níveis de HSP70 semelhantes ao controle. Níveis aumentados de TBARS e de radicais livres foram encontrados no grupo hipóxia em comparação ao controle, interessante, no grupo previamente tratado com terapia de FBM pré hipóxia observamos queda destes marcadores de estresse oxidativo, trazendo valores semelhantes ao controle. Em conjunto, os dados sugerem que a FBM possui potencial como terapia de proteção celular em relação aos danos oxidativos em condições de

hipóxia, evidenciado pela expressão de enzimas antioxidantes e redução dos níveis de proteínas carboniladas e radicais livres.

**Palavras-chave:** Fotobiomodulação, HUVEC, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo.

## **ABSTRACT**

Long considered to be an inert cell layer, the endothelium is now recognized as an important regulator of major physiological functions. Endothelial cells respond to chemical stimuli and secrete factors that modulate various physiological processes, especially under hypoxia. This condition can trigger adaptive responses and have harmful effects if it persists for prolonged periods, causing transcriptional changes that result in changes in cellular homeostasis. Photobiomodulation therapy (PBM) can stimulate collagen production, promote DNA and protein synthesis, increase ATP content, modulate cell migration and proliferation, accelerate tissue repair, and induce cell differentiation. In this context, the evaluation of cellular adaptations to hypoxia can provide knowledge to improve treatments and reduce these losses. This in vitro study aimed to evaluate the effects of pre-hypoxic PBM on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), to prevent possible damage caused by hypoxia. The methodology included gene expression and protein activity through in vitro tests. The cells were characterized by the expression of CD31 APC and CD146 APC by flow cytometry. The cells, kept in culture, were released from a 75cm<sup>2</sup> matrix bottle and seeded in 25 cm<sup>2</sup> bottles at a quantity of 1x10<sup>6</sup>. Our results showed that hypoxia only promoted a strong reduction in cell viability and that PBM applied pre-hypoxia increased this parameter. The mRNA expressions of the antioxidant enzymes SOD1 and CAT were reduced by hypoxia, and were increased with the use of PBM. The activities of SOD and GPx were increased by PBM. The expression of Hsp1a/b (HSP70), a cell damage biomarker, was increased by hypoxia, and this effect was blocked by the action of PBM, demonstrating HSP70 levels similar to the control. Increased levels of TBARS and free radicals were found in the hypoxia group compared to the control, interestingly, in the group previously treated with pre-hypoxic PBM therapy we observed a decrease in these oxidative stress markers, bringing values similar to the control. Together, the data suggest that PBM has the potential as a cell protection therapy against oxidative damage under hypoxic conditions, evidenced by the expression of antioxidant enzymes and the reduction of levels of carbonylated proteins and free radicals.

**Keywords:** Photobiomodulation, HUVEC, antioxidant enzymes, oxidative stress.

# Sumário

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | INTRODUÇÃO .....                                | 18 |
| 1.1.  | Endotélio e Células Endoteliais .....           | 18 |
| 1.2.  | Hipóxia .....                                   | 21 |
| 1.3.  | Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo ..... | 23 |
| 1.4.  | Fotobiomodulação .....                          | 24 |
| 1.5.  | Biomarcadores .....                             | 27 |
| 1.5.1 | Enzimas Antioxidantes .....                     | 28 |
| 1.6.  | Justificativa e Relevância .....                | 29 |
| 2.    | OBJETIVOS.....                                  | 30 |
| 2.1.  | Objetivo Geral .....                            | 30 |
| 2.2.  | Objetivos específicos .....                     | 30 |
| 3.    | MATERIAIS E MÉTODO.....                         | 31 |
| 3.1.  | Tipo de Estudo.....                             | 31 |
| 3.2.  | Local .....                                     | 31 |
| 3.3.  | Amostra.....                                    | 31 |
| 3.4.  | Cultivo de Células .....                        | 32 |
| 3.5.  | Delineamento do Estudo .....                    | 33 |
| 3.6.  | Protocolo de Fotobiomodulação .....             | 33 |
| 3.7.  | Indução de Hipóxia .....                        | 34 |
| 3.8.  | Determinação TBARS .....                        | 35 |

|                |   |           |
|----------------|---|-----------|
| <b>3.9.</b>    | <b>Proteínas carboniladas .....</b>                                       | <b>35</b> |
| <b>3.11.</b>   | <b>Análise da expressão gênica .....</b>                                  | <b>36</b> |
| <b>3.11.1.</b> | <b>Tratamento do RNA total e Integridade das amostras .....</b>           | <b>37</b> |
| <b>3.11.2.</b> | <b>Síntese de DNA complementar (cdNA) - Transcrição Reversa .....</b>     | <b>37</b> |
| <b>3.11.3.</b> | <b>Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR .....</b> | <b>37</b> |
| <b>3.12.</b>   | <b>Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes .....</b>          | <b>38</b> |
| <b>3.12.1.</b> | <b>Ensaio de atividade da superóxido dismutase (SOD) .....</b>            | <b>38</b> |
| <b>3.12.2.</b> | <b>Ensaio de atividade da catalase (CAT) .....</b>                        | <b>39</b> |
| <b>3.12.3.</b> | <b>Ensaio de atividade da glutatona peroxidase (GPx) .....</b>            | <b>39</b> |
| <b>3.13.</b>   | <b>Análise Estatística .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>4.</b>      | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4.1.</b>    | <b>Viabilidade celular .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>4.2.</b>    | <b>RNA das 3 principais enzimas antioxidantes .....</b>                   | <b>41</b> |
| <b>4.3.</b>    | <b>Expressão de RNA de Hspa1 a/b .....</b>                                | <b>42</b> |
| <b>4.4.</b>    | <b>Quantificação das proteínas carboniladas .....</b>                     | <b>43</b> |
| <b>4.5.</b>    | <b>Quantificação das TBARS .....</b>                                      | <b>44</b> |
| <b>4.6.</b>    | <b>Atividade das enzimas antioxidantes .....</b>                          | <b>45</b> |
| <b>4.7.</b>    | <b>Determinação de radicais livres .....</b>                              | <b>46</b> |
| <b>5.</b>      | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>6.</b>      | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>7.</b>      | <b>CONCLUSÃO .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>8.</b>      | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>9.</b>      | <b>ANEXOS .....</b>   | <b>63</b> |

|      |                 |    |
|------|-----------------|----|
| 8.1. | Checklist ..... | 63 |
|------|-----------------|----|

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Protocolo de Fotobiomodulação.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Vasculogênese.

**Figura 2.** Efeito do gradiente de tensão de oxigênio e distância de difusão na disponibilidade de oxigênio para as células.

**Figura 3.** Monocromacidade.

**Figura 4.** Caracterização das células HUVECs

**Figura 5.** Aparelho Twin FLEX-LASER, MMOptics Ltd (São Carlos, SP, Brasil

**Figura 6.** (AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido).

**Figura 7.** Efeito da hipóxia na viabilidade das células HUVECs na ausência e presença de FBM.

**Figura 8A.** Expressão de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes SOD1.

**Figura 8B.** Expressão de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes CAT.

**Figura 8C.** Expressão de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes GPx4.

**Figura 9.** RNA da proteína de choque térmico 70.

**Figura 10.** Quantificação de proteínas carboniladas.

**Figura 11.** Quantificação de TBARS.

**Figura 12A.** Quantificação proteica das proteínas antioxidantes CAT.

**Figura 12B.** Quantificação proteica das proteínas antioxidantes GPx.

**Figura 12C.** Quantificação proteica das proteínas antioxidantes SOD.

**Figura 13.** Determinação de radicais livres.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ECs, Células endoteliais;

TRP Receptor transiente;

NO, Óxido nítrico;

VEGF, Fator de crescimento endotelial vascular;

HUVEC, Células endoteliais da veia umbilical humana;  
O<sub>2</sub>, Oxigênio;  
HIF-1, Fator induzível por hipóxia-1;  
HRE, Elemento de resposta à hipóxia;  
ARNT, Translocador nuclear de hidrocarboneto arílico;  
PAS, Per-ARNT-Sim;  
bHLH, Hélice-alçahélice básica;  
TAD, Domínios de transativação;  
CBP/p300, Proteína de ligação à proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; ODDD, Domínio de degradação dependente de oxigênio;  
2-OG, 2-oxoglutarato;  
PHD, Domínio prolil hidroxilase;  
VHL, Von Hippel-Lindau;  
FIH-1, Fator inibidor HIF-1; ARD1, parada-defeituosa-1;  
MAPK, Proteína quinase ativada por mitógeno;  
PTEN, Homólogos de fosfatase e tensina deletados no cromossomo 10;  
LY294002, 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona;  
PD98095, 2-(2-amino-3-metoxifenil)-oxanftalen-4-ona;  
PI3K, Fosfoinositide-3 quinase; YC-1, 3-(5-hidroxi-metil-2-furil)-1-benzilindazole;  
mRNAs, RNAs mensageiros;  
tRNAs) Transportadores RNA;  
rRNAs, Ribossômicos;  
OMICS, Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica;  
PGI<sub>2</sub>, Prostaciclina;  
ET-1, Endotelian;  
TXA<sub>2</sub>, Tromboxano A<sub>2</sub>;  
LDLc, Lipoproteína de baixa densidade;  
eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial;  
nNOS, Óxido nítrico sintase neuronal;  
iNOS, Óxido nítrico sintase induzível;  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Nitrato;  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Nitrito;

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Ânion superóxido;

OH<sup>-</sup>, Hidroxila;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Peróxido de hidrogênio;

PBM, Fotobiomodulação;

LEDs, Lasers de baixa intensidade ou diodos emissores de luz;

VIS, Faixa do visível;

NIR, Infravermelho próximo;

Ca<sup>2+</sup>, Cálcio;

EROs, Espécies reativas de oxigênio;

ATP, Adenosina trifosfato.

SOD, Dismutase de sódio.

CAT, Catalase.

GPx4, Glutathione peroxidase 4.

TBARS, Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Endotélio e Células Endoteliais

O endotélio é o tecido epitelial que reveste o interior dos vasos sanguíneos, como artérias, veias e capilares, desempenhando um papel crucial na regulação do fluxo sanguíneo e na manutenção da homeostase do organismo [1,2]. Ele consiste em uma camada única de células endoteliais (ECs) que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos em todo o sistema cardiovascular, desde o coração até os menores capilares [3]. O endotélio é um órgão dinâmico, metabolicamente ativo e mecanicamente adaptável, separando a parede do vaso do sangue e seus componentes [4]. Apesar de ter sido considerado por muito tempo como uma camada celular inerte, o endotélio é agora reconhecido como um importante regulador das principais funções fisiológicas [5,6], formando uma barreira semipermeável ao longo do interior dos vasos sanguíneos, unidas por junções estreitas, que permitem a comunicação celular [7,8].

As ECs estão dispostas em uma configuração adjacente umas às outras, com um espaço extracelular reduzido, seguindo a direção do fluxo sanguíneo [9]. Entre as ECs e o tecido conjuntivo subjacente encontra-se a lâmina basal, uma camada composta principalmente por colágeno tipo IV, proteoglicanas e glicoproteínas como a laminina e a entactina [10]. Além de sua função estrutural, a lâmina basal desempenha um papel crucial na regulação da proliferação e diferenciação celular, na manutenção da polaridade e do metabolismo celular, bem como na transdução de sinais [11]. As ECs desempenham um papel crucial na regulação do fluxo sanguíneo, troca de substâncias e resposta a lesões vasculares. Estas células também estão envolvidas na regulação do tônus vascular, na manutenção da permeabilidade vascular e na modulação da resposta inflamatória, possuindo a capacidade de sintetizar e liberar vários fatores que afetam o fluxo sanguíneo, como o óxido nítrico (NO), a endotelina e a prostaciclina. Além disso, a regulação do fluxo sanguíneo pelas ECs desempenha um papel crítico em processos fisiológicos importantes, como a regulação da pressão arterial e a resposta ao exercício físico [12,13,14].

As ECs possuem a capacidade de responder a estímulos químicos que ativam receptores acoplados a proteínas G, bem como a forças mecânicas geradas pelo fluxo

sanguíneo. Em resposta a esses estímulos, as ECs secretam fatores químicos que desempenham um papel fundamental em diversos processos fisiológicos [15], principalmente na regulação de dois processos complexos essenciais para a manutenção da homeostase do organismo: a coagulação sanguínea e a angiogênese [16]. As ECs possuem a capacidade de sintetizar e secretar diversos fatores envolvidos na coagulação, além de apresentarem moléculas de adesão que permitem a interação com as plaquetas e os fatores de coagulação circulantes [17]. A interação entre as ECs e as plaquetas é crucial para a formação do tampão hemostático primário, enquanto a ativação dos fatores de coagulação na superfície das ECs é necessária para a formação do coágulo estável [18]. Esses eventos envolvem a ativação de várias vias de sinalização celular e a expressão de proteínas como a trombosmodulina, a via do fator tissular, o inibidor do ativador de plasminogênio e o ativador do plasminogênio tipo tecidual [19]. Além disso, as ECs também produzem e secretam fatores anticoagulantes, como a proteína C e o inibidor da via do fator tissular, desempenhando um papel de limitação da coagulação [20]. Portanto, as ECs desempenham um papel crítico na regulação da coagulação sanguínea, e sua disfunção pode resultar em doenças como trombose, hemorragia e aterosclerose [21].

A angiogênese, processo fisiológico responsável pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, depende de diversas funções das ECs. Esse processo ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, a organogênese e a cicatrização de feridas, mas também está envolvido em condições patológicas, incluindo carcinogênese, retinopatia diabética e poliartrite crônica [22]. Durante a angiogênese, as ECs secretam enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal vascular, permitindo a migração das ECs através da membrana basal em direção à matriz perivascular. Em seguida, estas células se proliferam, aderem e se conectam umas às outras para formar estruturas semelhantes a tubos. A matriz perivascular é remodelada e as ECs são envolvidas por células musculares lisas vasculares. A formação de anastomoses vasculares ocorre, interconectando as redes vasculares recém-formadas. Essas etapas são reguladas por uma variedade de citocinas, componentes da matriz extracelular e enzimas proteolíticas [23]. **(Figura 1)**

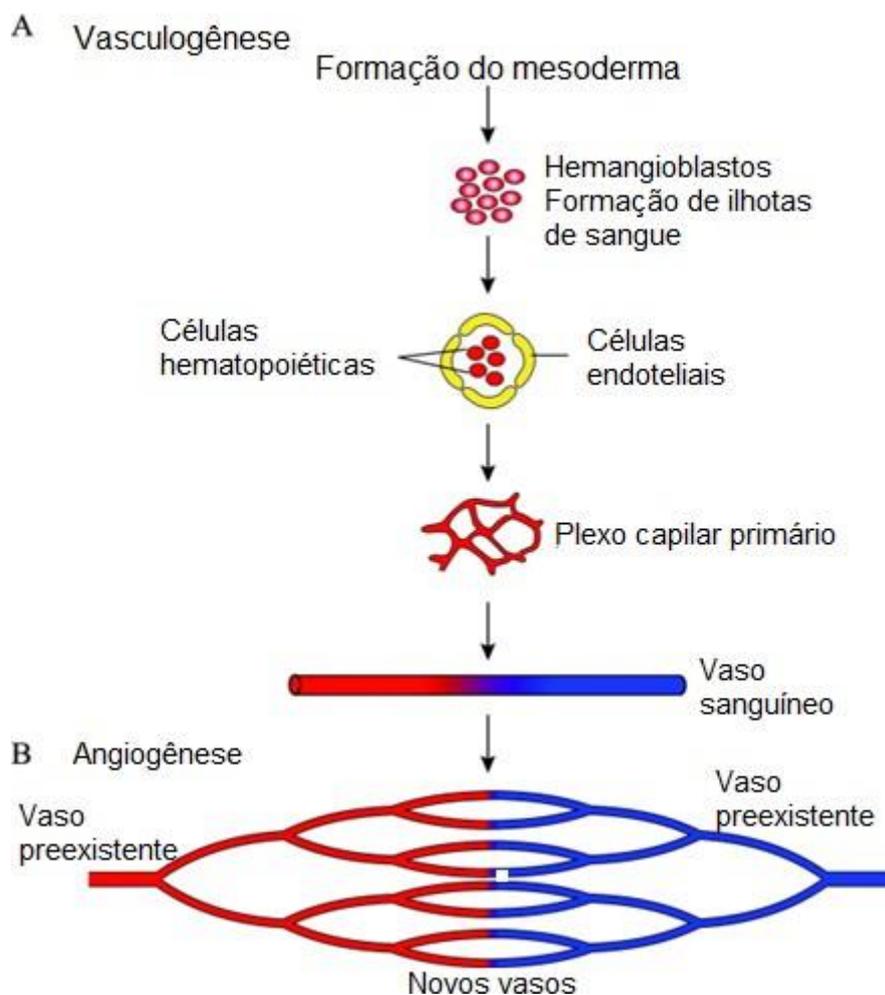


Figura 1. A- No desenvolvimento, as células mesodérmicas se diferenciam em hemangioblastos causando à formação de ilhotas sanguíneas primitivas. Depois os hemangioblastos periféricos se diferenciam em angioblastos, os precursores das células endoteliais. Ocorre a ativação quimiotática e haptotática, então as células endoteliais migram permitindo a fusão das ilhotas sanguíneas e sua remodelação em estruturas tubulares, dando assim origem ao primeiro plexo vascular primitivo. Os plexos vasculares se remodelam em vasos maiores, por meio do processo de vasculogênese, que leva à vascularização do embrião. B- Em contraste com a vasculogênese, a angiogênese é um procedimento de neovascularização pelo qual novos vasos sanguíneos se formam a partir dos preexistentes. (Adaptado de Laurent Lamallice et al. *Endothelial cell migration during angiogenesis*. 2007).

Em condições fisiológicas, as ECs desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase vascular e do crescimento dos vasos sanguíneos, atuando como mediadoras na comunicação entre o tecido e o sangue [24]. Por meio de diversos mecanismos, as células endoteliais podem reduzir a ocorrência de trombose, controlando a expressão de receptores para substâncias pró-coagulantes e anticoagulantes, e influenciando o sistema de coagulação [25]. A adesão das plaquetas aos leucócitos é um estágio inicial que leva à exsudação dos leucócitos em áreas inflamadas ou infectadas, seguida pela interação e agregação de plaquetas-leucócitos e, por fim, pela obstrução dos vasos sanguíneos. As células endoteliais

desempenham um papel antitrombótico por meio da produção de várias substâncias vasoativas, como endotelina, angiotensina, NO e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [25, 26, 27, 28].

A dinâmica das células endoteliais pode afetar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e adenosina trifosfato (ATP). Essa dinâmica também pode depender de alterações na concentração intracelular de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), do esgotamento dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  e de eventos de sinalização de entrada e saída de  $\text{Ca}^{2+}$  [29, 30,31, 32].

## 1.2. Hipóxia

A hipóxia é caracterizada pela redução da quantidade de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), resultando em um gradiente de tensão de oxigênio diminuído e, conseqüentemente, na diminuição da disponibilidade de oxigênio para as células [33]. O gradiente de tensão de oxigênio refere-se à diferença na concentração de oxigênio entre duas regiões distintas, geralmente entre os pulmões, onde há uma alta concentração de oxigênio, e os tecidos periféricos, onde a concentração de oxigênio é menor. Esse gradiente desempenha um papel fundamental na difusão do oxigênio dos pulmões para os tecidos. Por meio do processo de difusão, as moléculas de oxigênio movem-se de áreas com alta concentração para áreas com baixa concentração [33]. Dessa forma, o oxigênio se difunde dos alvéolos pulmonares para os capilares pulmonares e é transportado pelo sangue até os tecidos periféricos. A distância de difusão refere-se à distância física que o oxigênio precisa percorrer para alcançar as células a partir dos capilares sanguíneos. Quanto maior for essa distância, mais desafiadora se torna a entrega eficiente de oxigênio às células (conforme ilustrado na **Figura 2**). A eficiência da troca de gases, como oxigênio e dióxido de carbono, depende da disponibilidade de uma superfície de troca adequada. Nos pulmões, os alvéolos possuem uma área superficial ampla, o que permite uma troca eficiente de gases entre o ar alveolar e os capilares pulmonares. Da mesma forma, nos tecidos periféricos, os capilares formam uma extensa rede, ampliando a área disponível para a difusão do oxigênio antes de sua liberação para as células [33,34].

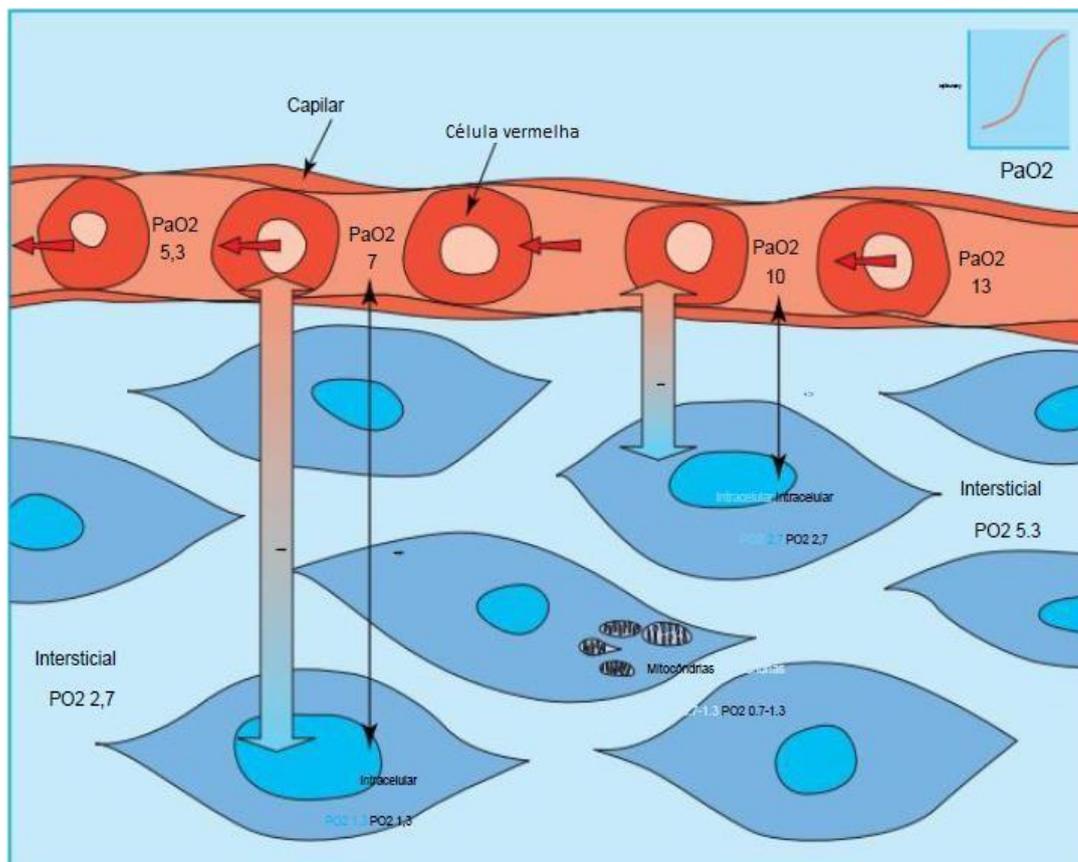


Figura 2. Efeito do gradiente de tensão de oxigênio e distância de difusão na disponibilidade de oxigênio para as células. (Adaptado de R M Leach, D F Treacher. *Oxygen transport2. Tissue hypoxia*, 1998).

A hipóxia pode desencadear respostas adaptativas celulares e ter efeitos prejudiciais se persistir por períodos prolongados ou em situações graves. A diminuição dos níveis de O<sub>2</sub> pode influenciar a regulação da expressão gênica, bem como causar modificações pós-traducionais, resultando em alterações do metabolismo celular [35]. A adaptação a baixas tensões de oxigênio em células e tecidos envolve a indução da expressão de vários genes relacionados à angiogênese, metabolismo do ferro, metabolismo da glicose, proliferação e sobrevivência celular.

O principal mediador dessa resposta adaptativa é o fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1), um fator de transcrição sensível ao oxigênio [36, 37]. Dentre as múltiplas isoformas do fator induzível por hipóxia (HIF), HIF-1 e HIF-2 são as mais bem estudadas e compreendidas. O HIF-1 é composto por duas subunidades: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  (também conhecido como ARNT - Núcleo Translocador Nuclear do Receptor de Hidrocarboneto Aromático) [38]. Enquanto a subunidade HIF-1 $\beta$  é expressa de forma constante, a estabilidade e atividade da subunidade HIF-1 $\alpha$  são reguladas pelos níveis de oxigênio. Em condições normóxicas (nível normal de oxigênio), o HIF-1 $\alpha$  é

rapidamente degradado, porém, em condições hipóxicas, sua estabilidade aumenta, permitindo que ele forme um complexo com a subunidade HIF-1 $\beta$ , o que resulta na ativação transcricional de genes-alvo [39, 40].

O HIF-1 tem um papel importante na regulação de mais de 100 genes e possui um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) que controla sua estabilidade de acordo com os níveis de oxigênio [41]. Estudos posteriores revelaram que o HIF-1 é expresso de maneira generalizada em tecidos humanos e de camundongos, desempenhando um papel essencial em várias respostas fisiológicas à hipóxia, como eritropoiese, glicólise e angiogênese, que ajudam a compensar rapidamente a deficiência de oxigênio [42]. Por outro lado, o HIF-2 possui uma estrutura semelhante ao HIF-1, mas sua expressão varia, sendo encontrado apenas em certos tecidos, como pulmão, endotélio e corpo carotídeo [43]. O papel do HIF-3 ainda é pouco compreendido, mas evidências sugerem que sua forma de *splicing* alternativo pode se ligar e inibir a atividade transcricional do HIF-1 [44].

### **1.3. Disfunção Endotelial e Estresse Oxidativo**

A disfunção endotelial refere-se a uma condição na qual as células endoteliais apresentam uma alteração em sua função normal, e isso pode ser atribuído à diminuição da disponibilidade de oxigênio nos tecidos (hipóxia) [45]. Essa disfunção é caracterizada por um desequilíbrio entre os efeitos dos mediadores endoteliais protetores, responsáveis pela regulação do tônus vascular, agregação plaquetária e fibrinólise, e os fatores endoteliais prejudiciais. Dentre os mediadores protetores endoteliais, o NO, a bradicinina e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) destacam-se por suas propriedades benéficas [46].

O NO é um radical livre gasoso que desempenha um papel crucial na manutenção do tônus vasomotor. Além disso, possui propriedades antiaterogênicas, inibindo a proliferação de células musculares lisas, a agregação plaquetária e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) [47]. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas conhecida como óxido nítrico sintases (NOS), que inclui três isoformas: a sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), a sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) e a sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) [48]. As duas primeiras isoformas são expressas constitutivamente em células endoteliais e neurônios, respectivamente. A iNOS é expressa em diferentes tipos de

células, como leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais e células musculares lisas vasculares, em resposta a estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, lipopolissacarídeos bacterianos e mediadores do estresse oxidativo [49]. Os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), produtos resultantes da oxidação do NO, são os principais metabólitos do NO e podem ser utilizados como indicadores de sua síntese em alguns sistemas biológicos [50].

A hipóxia está associada à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo, que desempenham um papel significativo nos efeitos prejudiciais da hipóxia em células e tecidos. As EROs são moléculas altamente reativas que contêm oxigênio, como o radical livre superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $-\text{OH}$ ) [51]. Durante a hipóxia, uma série de eventos celulares e moleculares ocorrem, resultando em um aumento na produção de EROs. Isso pode ser causado pela diminuição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva ao vazamento de elétrons e à geração de superóxido. Além disso, a reoxigenação após períodos prolongados de hipóxia também pode levar a uma produção excessiva de EROs [52].

Durante a hipóxia, a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenha um papel fundamental na estabilização da subunidade  $\alpha$  do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1 $\alpha$ ). Especificamente, as EROs oxidam cisteínas específicas presentes no HIF-1 $\alpha$ , inibindo a ação das hidroxilases dependentes de oxigênio, que normalmente marcam o HIF-1 $\alpha$  para degradação. Como resultado, o HIF-1 $\alpha$  é estabilizado em condições de hipóxia, permitindo sua acumulação e formação de um complexo com a subunidade  $\beta$  do HIF-1. Isso leva à ativação transcricional de genes-alvo envolvidos na adaptação celular à hipóxia. Esses genes-alvo incluem aqueles relacionados à angiogênese, glicólise, transporte de oxigênio e outros processos adaptativos à baixa disponibilidade de oxigênio. Essa resposta adaptativa é essencial para garantir a sobrevivência e o funcionamento adequado das células em condições de hipóxia [53].

#### **1.4. Fotobiomodulação**

A terapia de laser de baixa potência, também conhecida como fotobiomodulação (FBM), é um método terapêutico em ascensão no qual células ou tecidos são expostos a lasers de baixa intensidade ou diodos emissores de luz (LEDs)

com comprimentos de onda na faixa visível (VIS, 400-700 nm) e infravermelho próximo (NIR, 700-1000 nm) **Figura 3**, [54]. A FBM tem sido considerada uma abordagem terapêutica capaz de modular diversos processos biológicos, desde que respeitados critérios específicos relacionados à luz do laser e às condições do tecido a ser irradiado. Essa terapia é capaz de induzir efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e estimuladores da cicatrização por meio da proliferação celular [55-64].

A luz é composta por partículas chamadas fótons, cuja energia está relacionada ao seu comprimento de onda. Esses fótons transferem sua energia para moléculas orgânicas específicas, conhecidas como cromóforos. Os cromóforos são grupos funcionais orgânicos presentes em moléculas que absorvem luz na região ultravioleta ou visível. Eles são responsáveis por absorver a energia luminosa. No contexto da PBM, os principais alvos celulares são a citocromo c oxidase presente nas mitocôndrias e os canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) localizados nas membranas plasmáticas, que parecem ser influenciados pela luz emitida pelo laser NIR [65, 66, 67].

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

*Figura 3. Monocromaticidade: A luz laser é formada por fótons de igual comprimento de onda, sendo assim, cor única. (Fonte: Moreira Francine manual prático para uso dos lasers na odontologia, 2020).*

Por um longo tempo, sabe-se que a ação da FBM depende principalmente das interações entre a luz e as mitocôndrias, que resultam em estimulação da respiração mitocondrial e na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) [65]. É importante ressaltar a estreita relação existente entre a liberação de EROs, especialmente pelas mitocôndrias, e a sinalização de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sendo que as EROs regulam a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e afetam as atividades mitocondriais e a produção de EROs [68]. Além disso, estudos têm demonstrado que a FBM estimula a produção de colágeno,

promove a síntese de DNA e proteínas, aumenta o conteúdo de ATP, modula a migração e proliferação celular, acelera o reparo tecidual e induz a diferenciação celular [69-74]. Esses achados evidenciam os efeitos benéficos e a capacidade da FBM de modular diferentes processos celulares e teciduais, contribuindo para seu potencial terapêutico.

Estudos têm mostrado que a FBM pode estimular a síntese de DNA [75] e o aumento do conteúdo de colágeno [76] e ATP [77]. Em ECs, a FBM tem sido relacionada ao aumento da proliferação celular, da expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) [78], além de alterar a organização do citoesqueleto endotelial [79].

Vários grupos de pesquisa têm investigado o efeito da FBM em ECs [80, 81, 82]. Em geral, o espectro de luz visível (vermelho 600 a 700nm) apresenta resultados benéficos na bioestimulação celular. O efeito da FBM em sete diferentes comprimentos de onda (de 625 a 810 nm) em fibroblastos e células endoteliais foi analisado em um estudo acompanhando a taxa de proliferação celular após 72h de cultivo [83]. Os autores encontraram aumento no crescimento tanto das células endoteliais (e fibroblastos) em todos os comprimentos de onda estudados, exceto para células irradiadas com FBM a 810 nm.

Por outro lado, um estudo utilizando laser diodo de 670 nm com doses de 2, 4 e 8 J/cm<sup>2</sup> observou aumento da proliferação celular em HUVECs quando comparado com HUVECs não irradiadas [80]. Os autores sugerem que a FBM pode agir diretamente nas ECs para estimular a proliferação celular, o que pode ocasionar melhora na reparação tecidual. No mesmo estudo, os autores verificaram aumento dose-dependente da proliferação de HUVECs pela PBM. Outro estudo [80] investigou os efeitos da FBM na morfologia das células endoteliais, sugerindo alteração da organização do citoesqueleto endotelial após radiação.

Um estudo de Góralczyk et al. [82] verificou efeito da FBM com o comprimento de onda de 635 nm (1.875 mW / cm<sup>2</sup>) no número de células endoteliais. Doses de energia de 2, 4 e 8 J/ cm<sup>2</sup> aumentaram significativamente o número de células ( $p = 0,0041$ ), sendo o maior valor observado em doses menores de energia (2 e 4 J/ cm<sup>2</sup>) e foi cerca de 23% maior do que no grupo controle. Concentrações mais baixas de sVEGFR-1 e sVEGFR-2 no sobrenadante em comparação com o grupo controle poderiam indicar, de forma indireta, um aumento da ligação do VEGF em receptores em HUVECs irradiadas, resultando em aumento da proliferação por influência da

FBM. Assim, os autores sugerem que a FBM pode aumentar a proliferação de HUVECs e diminuir a concentração de VEGFR-1 solúvel [83].

Além disso, foi também mostrado que a FBM alterou a taxa de sobrevivência de HUVEC de maneira dose-dependente, onde doses mais elevadas (60 e 80 J/cm<sup>2</sup>) reduziram significativamente a viabilidade celular, quando comparado aos grupos irradiados com doses menores (4 e 8 J/cm<sup>2</sup>) [84].

## 1.5. Biomarcadores

O genoma é amplamente reconhecido como o repositório das informações biológicas de um organismo vivo [85]. No entanto, isoladamente, ele não é capaz de liberar essas informações para a célula. Para que isso ocorra, é necessária a atuação conjunta de enzimas e proteínas específicas, que participam de complexas reações bioquímicas conhecidas como expressão do genoma. Nesse contexto, surge o conceito de transcriptoma, que se refere ao conjunto de moléculas de RNA derivadas desses genes codificadores de proteínas, responsáveis por transportar as informações necessárias para a célula quando necessário, culminando no proteoma, que é o resultado da expressão genômica. Esse processo desempenha um papel fundamental ao definir as reações bioquímicas que cada célula é capaz de realizar [86, 87, 88].

Inicialmente, o termo transcriptoma se referia apenas ao conjunto de RNA mensageiros (mRNA), que são sintetizados a partir do DNA desses genes e desempenham papel crucial na síntese de proteínas. No entanto, estudos posteriores revelaram a participação de outros grupos de RNAs não codificantes, como os RNAs transportadores (tRNAs) e os ribossômicos (rRNAs) [88, 89, 90]. É importante destacar que, embora os mRNA sejam degradados nos estágios finais da expressão do genoma, eles correspondem a menos de 4% do total de RNA em uma célula [91]. Essas descobertas ampliam nossa compreensão dos processos envolvidos na expressão genômica e evidenciam a diversidade e complexidade do transcriptoma. Por meio dessas descobertas deu-se início a busca da ciência de entender as estruturas moleculares das proteínas, as interações entre elas e com as demais moléculas biológicas (carboidratos, lipídios, DNA, etc). Por intermédio desse estímulo, iniciou-se a busca pela detecção de biomarcadores em processos deficientes ou incomuns dentro de uma via metabólica, originando informações em modelo de dados

computacionais e implicando o perseverante avanço das tecnologias e da informática [92, 93].

A denominação biomarcadores, também conhecidos como marcadores biológicos, refere-se a aspectos que podem ser medidos experimentalmente, permitindo indicar a ocorrência de uma função normal ou patológica em um organismo, bem como o efeito de uma intervenção terapêutica [94]. Essa classificação destaca o potencial dos biomarcadores em estimar estados patológicos, detectar alterações ou disfunções nos processos fisiológicos e orientar pesquisas que visam o desenvolvimento de terapias mais eficazes, com menor incidência de reações adversas e não invasivas. Portanto, a busca por novos biomarcadores, com o auxílio de diversas abordagens "ômicas" (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), tornou-se o principal objetivo das pesquisas translacionais [94].

Alcançar essa meta é possível por meio da comparação entre estados fisiológicos ou modificações causadas por doenças [96], investigando diferenças que se refletem na atividade molecular diferencial de genes, na expressão de proteínas específicas e nos perfis metabólicos e seus padrões de sinalização. Com base nisso, as espécies moleculares, como genes, proteínas, polimorfismos de DNA e miRNAs, que representam as alterações mais significativas observadas, podem ser identificadas como potenciais "marcadores" de doenças [95].

Esse processo resulta em uma grande quantidade de dados computacionais, como listas, equações e gráficos, que exigem o uso de ferramentas capazes de realizar a integração preditiva dessas informações, ou seja, a construção de modelos preditivos de doenças ou soluções terapêuticas com base nos dados quantitativos obtidos de diversas fontes. Nesse contexto, a bioinformática se torna uma valiosa aliada, fornecendo recursos para a análise e interpretação desses dados complexos [95, 96].

### **1.5.1 Enzimas Antioxidantes**

Os seres vivos possuem defesas enzimáticas naturais como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) [97]. Essas enzimas fazem parte do sistema antioxidante, sua função dá-se em prevenção ao dano celular gerado por radicais livres [98].

A SOD é uma enzima que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxido. A GPx catalisa uma reação que converte a glutathiona monomérica reduzida (GSH) em dissulfeto de glutathiona (GSSG). A CAT tem a função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio [97].

## 1.6. Justificativa e Relevância

No organismo, a hipóxia ocorre devido à redução no fornecimento de oxigênio, resultando em estado de asfixia ou, em menor grau, de isquemia breve que limita o fluxo sanguíneo para uma área específica. Durante a hipóxia, a pressão parcial de oxigênio diminui abaixo dos níveis aceitáveis, comprometendo o funcionamento de órgãos, tecidos e o metabolismo celular. Em condições normais, as pressões parciais de oxigênio variam de cerca de 150 mmHg nas vias aéreas superiores a aproximadamente 5 mmHg na retina. No sangue arterial, um valor inferior a 40 mmHg é considerado hipóxico [99].

Microambientes hipóxicos podem se desenvolver em condições como neoplasias, arteriosclerose, artrite e reações inflamatórias em geral [100]. No entanto, a privação de oxigênio também desencadeia uma via fisiológica que estimula o crescimento natural dos tecidos em mamíferos e a embriogênese [101].

Células sujeitas à hipóxia apresentam alterações que dificultam ou impedem a recuperação do tecido, podendo levar à disfunção e à ocorrência de morte celular. Dependendo da gravidade e da duração da hipóxia, os tecidos danificados podem não recuperar sua funcionalidade, mesmo quando terapias reconstrutivas são aplicadas [102, 103].

Os modelos *in vitro* são de grande importância, pois permitem isolar fenômenos específicos, estudar as respostas celulares e testar novos estímulos que podem contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) são amplamente estudadas, pois são facilmente isoladas e cultivadas, sendo consideradas um ótimo modelo experimental [5].

Nesse contexto, a avaliação das adaptações celulares à hipóxia pode fornecer conhecimentos para melhorar os tratamentos e reduzir essas perdas. O presente estudo visa avaliar os efeitos da pré-exposição à FBM aplicada em HUVECs na prevenção de danos decorrentes da condição de hipóxia e estresse oxidativo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente estudo in vitro teve como objetivo avaliar os efeitos da FBM pré indução de hipóxia em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECS), para prevenir possíveis danos gerados pela hipóxia.

### **2.2. Objetivos específicos**

Em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECS) tratadas com FBM e submetidas à hipóxia foi avaliado:

- o efeito na viabilidade das células;
- alterações de expressão gênica de componentes da via de transdução de estresse oxidativo;
- as atividades das enzimas antioxidantes;
- a expressão de biomarcadores de estresse celular e;
- a geração de radicais livres.

### 3. MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1. Tipo de Estudo

O presente estudo se caracterizou por uma pesquisa experimental *in vitro*.

#### 3.2. Local

Todo o cultivo celular foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Pós-graduação em Medicina - Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

#### 3.3. Amostra

Foi utilizada nos experimentos uma linhagem comercial de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC-C; ATCC® CRL-1730™), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, USA) e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni (UNINOVE). As células foram caracterizadas pela expressão de CD31 APC e CD146 APC pelo método de citometria de fluxo (**Figura 4**).

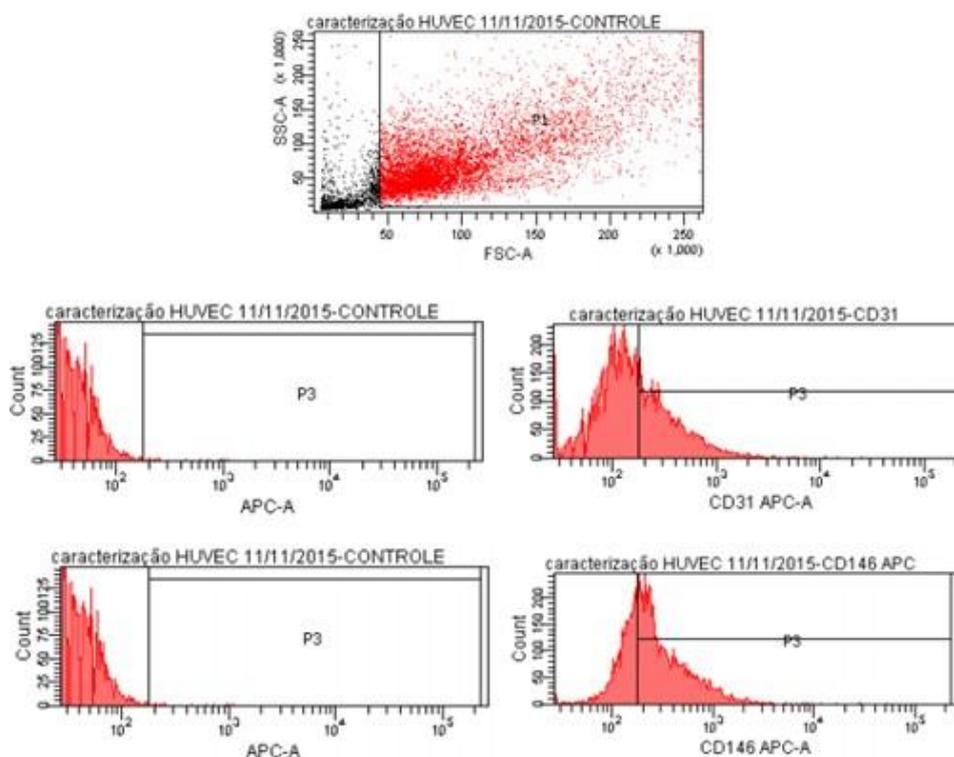


Figura 4. Caracterização das células HUVECs por citometria de fluxo e marcadores celulares específicos.

### 3.4. Cultivo de Células

As células foram descongeladas em banho Maria a 37° C sob agitação por 2 minutos, o conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico contendo 9 mL de meio de cultura (RPMI Medium 1640, Vitrocell pH 7.4) 10 mmol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 2 mmol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, BRL, Life Technologies, USA), 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell) e centrifugadas 125 g por 5 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensas em 12 mL de meio de cultura, e mantidas a 37° C com 5 % de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que a concentração de células atingisse confluência. Após proliferação as células foram tratadas com 5 mL de tripsina (0,5%) por 5 minutos e após o desprendimento celular foi acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O conteúdo celular foi transferido para um tubo graduado para 50 mL e centrifugado a 125 g por 5 minutos, em seguida foi realizado teste de viabilidade celular utilizando o ensaio de redução de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bíometo de difeniltetiazólio] e feita a

contagem das células. As células, mantidas em cultura, foram soltas de uma garrafa matriz de 75cm<sup>2</sup> e semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> na quantidade 1x10<sup>6</sup>

### 3.5. Delineamento do Estudo

As células foram divididas em três grupos, sendo eles:

**CONTROLE:** células cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB, sem estímulo.

**HIPÓXIA:** células cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB submetidas ao procedimento de hipóxia por anaerobiose.

**FBM + HIPÓXIA:** células cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB submetidas ao pré-tratamento com laser e ao procedimento de hipóxia por anaerobiose.

### 3.6. Protocolo de Fotobiomodulação

A FBM foi conduzida por meio de um aparelho Twin FLEX-LASER (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil; **Figura 5**), com os parâmetros apresentados a seguir:



Figura 5. Aparelho Twin FLEX-LASER, MMOptics Ltd (São Carlos, SP, Brasil).

Tabela 1. Protocolo de fotobiomodulação.

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| Comprimento de onda          | 660 nm                |
| Potência radiante média (mW) | 10 mW                 |
| Exposição radiante           | 1,5 J/cm <sup>2</sup> |
| Tempo de aplicação           | 60 segundos           |
| Área irradiada               | 0,04 cm <sup>2</sup>  |
| Energia total                | 0,6 J                 |

Foi realizada única aplicação no grupo FBM + Hipóxia após centrifugação em meio de cultura RPMI e SFB a 125 x g por 5 minutos. A aplicação da FBM ocorreu pela parte de baixo dos tubos cônicos. Os grupos controle e Hipóxia não receberam a irradiação do laser.

### 3.7. Indução de Hipóxia

A indução de hipóxia foi realizada artificialmente com a utilização de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Para tal, após um período de 24 horas para aderência das células, ao atingirem confluência de aproximadamente 80% e o grupo específico passar pelo pré-tratamento com FBM, os grupos Hipóxia e FBM + Hipóxia foram colocadas em sacos plásticos de fecho com o saquete capturador de oxigênio AnaeroGen (**Figura 6**). Dentro desse sistema, as garrafas permaneceram com as tampas semiabertas por 24 horas, período este designado adequado para efetividade da hipóxia sem grande perda celular [104].



Figura 6. AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido).

### 3.8. Determinação TBARS

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas pela avaliação endógena da oxidação lipídica segundo Ohkawa et al., (1979) e Bird e Draper (1984). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético a 12% (1:4 v/v), e em seguida este foi centrifugado a 15000 g por 3 minutos. Aos sobrenadantes foram adicionados o tampão TrisHCl, 50 mM, pH 7.0, vorteados por 20 segundos, e ácido tiobarbitúrico 0.67%, mantidos em água fervendo por 60 minutos, coletados em 5°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em 535 nm, em espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Os resultados foram expressos em nmol/ mL.

### 3.9. Proteínas carboniladas

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e colaboradores (1990). As células foram homogeneizadas (na diluição de 1: 20) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado, e então centrifugadas a 1500 g por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos e aos precipitados foram adicionados 0,5 mL de 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM em

2M de HCl). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, foram adicionados 500 µL de TCA 20% e os tubos agitados e centrifugados por 6 min. a 1500 g, sendo os sobrenadantes descartados, o excesso de DNPH removido, lavando-se os precipitados por três vezes com uma solução de etanol:acetato de etila (1:1), e, em seguida, agitando-se os tubos e centrifugando por 3 min. a 1500 g. Os precipitados resultantes foram dissolvidos em 1,0 mL de cloreto de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 15 min. a 37°C, para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360–370 nm foram determinadas, e os valores finais das proteínas carboniladas (nmol de DNPH incorporado/mg de proteína) calculados, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $E_{360}=22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.10. Quantificação de radicais livres**

O ensaio ROS-GLO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Promega) foi usado para medir alterações no nível de EROs, detectando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas amostras. As células foram plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (BD Falcon; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e após 24h de hipóxia, a solução de substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 µM) foi adicionada a cada poço. O substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage diretamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das células para gerar um precursor da luciferina. Após a incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a solução de detecção ROS-GLO foi adicionada a cada poço, seguido por 20 min de incubação a 25 ° C para gerar um sinal luminescente. A luminescência foi medida usando um leitor de microplacas.

### **3.11. Análise da expressão gênica**

As células dos grupos experimentais, após desaderidas, foram centrifugadas e aos precipitados foi adicionado Trizol® Reagent para extração do RNA total, conforme instruções do fabricante. Após rápida homogenização, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e o conteúdo foi agitado vigorosamente por 15 seg. Em seguida, o conteúdo foi mantido em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000 x g a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas (12000 x g/4°

C/10 min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000 x g/4° C/10 min), e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50 ul de água DEPC.

### **3.11.1 Tratamento do RNA total e Integridade das amostras**

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 nanoespectrofotometro (NanoDrop Products, Wilmington, USA) sendo que 1U A260 corresponde a 40ug de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes (A260/A230 ~1,8) e de proteínas (A260/A280 = 1,8-2,0). A integridade do RNA total foi avaliada pela observação da proporção das bandas referentes aos rRNA 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Life Technologies). Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1ug de RNA total (8 ul) foi incubado com 1 unidade (1 ul) de *DNase I/RNase Free* – (Invitrogen, EUA), na presença 1 ul de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl<sub>2</sub> por 15 min a 37° C, seguido de incubação a 65° C durante 10 minutos para inativação da DNase I. Após este procedimento, as amostras foram armazenadas a -80° C até realização da Transcrição Reversa.

### **3.11.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa**

Em 1 ug de RNA total tratado foram adicionados 2 µl de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (1ul) (Invitrogen), 2µl de Randon Primer (Invitrogen) 0,8 µl de oligonucleotídeos (DNTPs, 100 mM) e 4,2 ul de H<sub>2</sub>O DEPC para uma reação final de 20 µl para obtenção do cDNA. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20° C para futura realização da PCR em tempo Real.

### **3.11.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR**

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação do PCR com detecção fluorescente automatizada, realizada como auxílio do aparelho de detecção da sequência. A amplificação e aquisição dos dados foram realizadas com o corante SYBR Green em equipamento Abi Prism 7500 Fast (Applied Biosystems) como descrito previamente (Santana et al. 2016). Neste processo de excitação, a captação de fluorescência das fitas duplas é realizada em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo quantificação em tempo real das sequências do gene de interesse. O protocolo utilizado para a reação de PCR em tempo real foi o seguinte: em 1,0  $\mu$ l de cDNA, foram adicionados 5  $\mu$ l de Solução Fast Master Mix 2X (Applied Biosystems, EUA) e água suficiente para 10  $\mu$ l de reação em cada tubo cônico. As amostras aplicadas em duplicata e então incubadas a 95° C por 20s, e passaram por 40 ciclos térmicos a 95°C por 3s, 60°C por 30s. Os iniciadores (primers) utilizados para a reação de PCR foram para os genes da via de estresse oxidativo: SOD1 (dismutase de sódio), catalase, GPx4 (glutathione peroxidase) e HSP70 (*Heat Shock Protein 70*).

Os resultados, expressos em valor de CT, se referem ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção. A expressão dos genes foi normalizada pelo nível de expressão do gene *housekeeping* 18S RNA ribossômico, cuja expressão mostrou-se inalterada nas condições experimentais. O “software” SDS 1.4 *Software for 7500 Fast System* (Applied Biosystems) foi utilizado para o processamento dos dados.

Os valores de  $\Delta$ Ct das amostras foram determinados pela subtração do valor de Ct médio do mRNA dos genes analisados a partir do valor médio de Ct do gene *housekeeping* 18S RNAr. O parâmetro  $2^{-\Delta\Delta$ Ct foi utilizado para expressar os dados de expressão relativos.

### **3.12. Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes**

#### **3.12.1 Ensaio de atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade de SOD foi subsequentemente determinada em amostras de HUVECs por meio de kit de ensaio de atividade de SOD disponível comercialmente de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical; Ann Arbor, Michigan). Por meio da produção de superóxido dependente de xantina oxidase, este ensaio

indexa a atividade de todas as três SODs: SOD1 (citoplasmática), SOD2(mitocondrial) e SOD3 (extracelular). No dia do ensaio, 200  $\mu$ L do detector de radicais diluído foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços. Em seguida, 10 $\mu$ L de padrão diluído em série ou amostra diluída foram adicionados a cada poço. 20 $\mu$ L dexantina oxidase foram adicionados a cada poço o mais rápido possível. Após incubação de 30 minutos num agitador de placas, a absorvância foi lida entre 440 e 460 nm utilizando um leitor de placas. A absorvância dos padrões conhecidos foi usada para criar a equação de absorvância-concentração. A equação determinada foi então usada para calcular a concentração de cada amostra com base na absorvância. Padrões e amostras foram analisados em duplicata e calculada a média entre duplicatas. A atividade da SOD foi normalizada para o conteúdo de proteína (U/mg).

### **3.12.2 Ensaio de atividade da catalase (CAT)**

A atividade de catalase foi determinada de acordo com o método descrito por Ernest Beutler (BEUTLER, 1975). Amostras de todos os grupos experimentais (correspondendo a 35 $\mu$ g de proteínas) foram incubadas com PBS pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM e a absorvância foi monitorada por um minuto. A cinética de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 240nm (43,6M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em U/mg, onde U corresponde a atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

### **3.12.3 Ensaio de atividade da glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade de GPx foi determinada de acordo com o método descrito por Wendel (1981) e se baseia na oxidação do NADPH acompanhada a 340nm a 37°C. Amostras dos grupos experimentais (correspondendo a 35 $\mu$ g de proteínas) foram incubadas em 52 PBS pH 7,4 com glutathiona reduzida 1mM, NADPH 0,2mM e glutathiona reductase 1,8U/mL durante três minutos a 37°C. A absorvância foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm. Após três minutos de incubação, foi adicionado t-butilhidroxiperoxido 0,9mM para iniciar a reação. A absorvância foi monitorada por mais cinco minutos. A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do mesmo a 340nm (6,22M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

### 3.13. Análise Estatística

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis resultando em dados paramétricos para todos os grupos. Os resultados foram expressos em valores relativos para melhor compreensão. Os dados foram apresentados com média e erro padrão da média (EPM). Para testar as diferenças entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste ANOVA *One-Way* com *Post-Hoc* de Bonferroni. Foi estabelecido o valor de  $p < 0,05$  para significância estatística. As análises foram realizadas utilizando o software PRISM GraphPad, versão 10.0 para Windows.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Viabilidade celular

Primeiramente, foi analisado o efeito da hipóxia na viabilidade das células HUVECs na ausência e presença de FBM. Os resultados do MTT (kit de proliferação celular I) revelaram diminuição significativa na viabilidade do grupo com hipóxia. Adicionalmente, observou-se que a combinação FBM + hipóxia induziu maior viabilidade celular em relação ao grupo hipóxia somente. O grupo controle não mostrou diferença em relação ao grupo FBM + hipóxia (**Figura 7**).

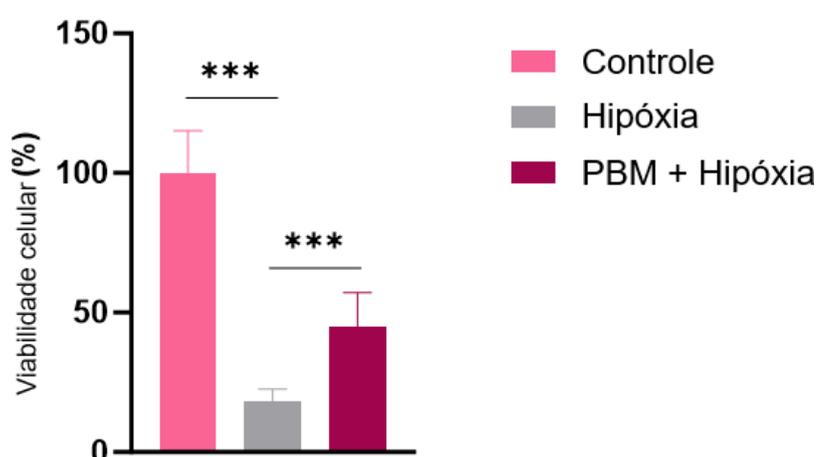


Figura 7. Efeito da hipóxia na viabilidade das células HUVECs na ausência e presença de FBM. Em porcentagem. Diminuição de viabilidade celular no grupo hipóxia comparado aos demais grupos ( $p \leq 0,001$ ). O grupo controle não apresentou significância em relação ao FBM + hipóxia. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Médias determinadas por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

### 4.2. RNA das 3 principais enzimas antioxidantes

Na **Figura 8** analisamos a expressão de RNA mensageiro das enzimas antioxidantes SOD1 (superóxido dismutase 1, em **A**), CAT (catalase, em **B**) e GPx4 (glutathiona peroxidase 4, em **C**). Em **A** observamos aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) da expressão de mRNA no grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia, quando comparado tanto com o grupo hipóxico quanto com o grupo controle. O grupo submetido à hipóxia demonstrou uma diferença significativa ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle.

Na **Figura 8B**, verificamos aumento na expressão de mRNA de CAT (Catalase) no grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com o grupo hipóxico e com o grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo hipóxico e o grupo controle.

Em relação à expressão de mRNA de GPx4 (Glutathiona peroxidase 4) (**Figura 8C**), observamos aumento da expressão gênica no grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia ( $p \leq 0,01$ ) em comparação ao grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ao comparar o grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia com o grupo apenas hipóxico. Também não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo hipóxico e o grupo controle.

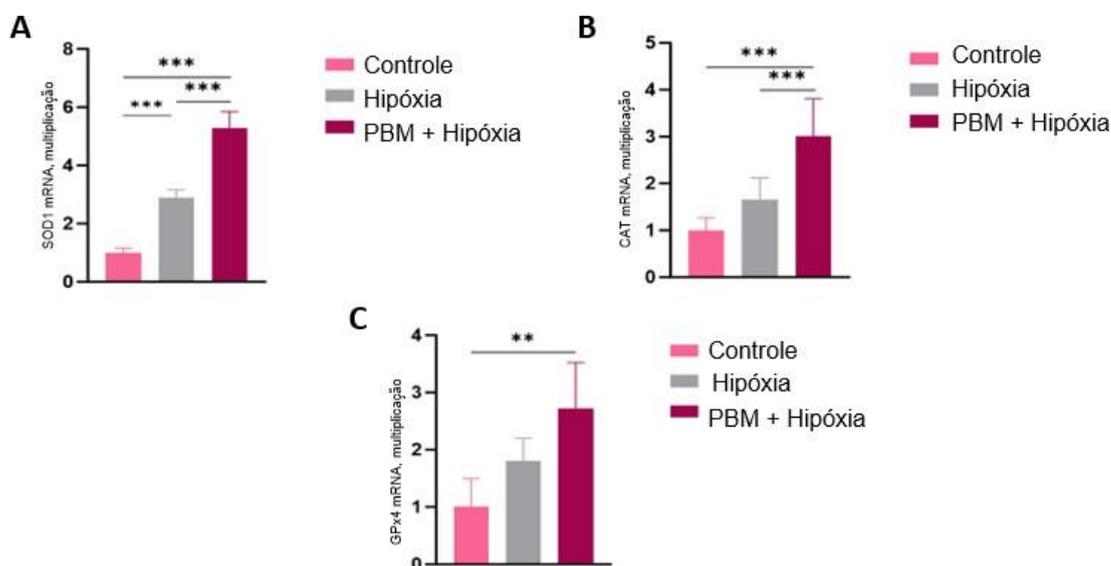


Figura 8A. Quantificação da expressão de RNA mensageiro de SOD1 nos grupos amostrais, em *fold change*. Aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) no grupo FBM + hipóxia, em relação aos outros dois grupos amostrais (grupo hipóxia e grupo controle). Aumento na expressão de RNA ( $p \leq 0,001$ ) ao comparar o grupo hipóxico com o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Figura 8B. Expressão de RNA mensageiro de CAT nos grupos amostrais, mostrada em *fold change*. Aumento ( $p \leq 0,001$ ) no grupo FBM + hipóxia, em relação aos grupos hipóxia e grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo hipóxico e o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Figura 8C. Expressão de RNA mensageiro de GPx4 nos grupos amostrais, em *fold change*. Houve aumento significativo ( $p \leq 0,1$ ) no grupo FBM + hipóxia, em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas ao comparar o grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia com o grupo apenas hipóxico. Também não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo hipóxico e o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Médias determinadas por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

### 4.3. Expressão de RNA de Hspa1 a/b

Na **Figura 9**, analisamos a expressão de RNA de **Hspa1 a/b**, também conhecida como proteína de choque térmico. Observamos aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) na expressão gênica no grupo submetido à condição de hipóxia em relação

ao grupo que recebeu a aplicação combinada de FBM e hipóxia. O grupo hipóxico apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Não observamos diferenças significativas entre o grupo que recebeu a FBM e hipóxia e o grupo controle.

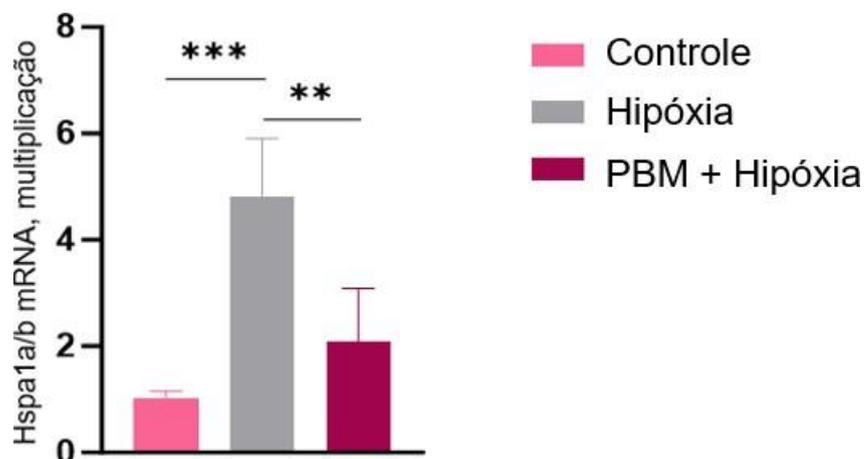


Figura 9. Expressão de RNA mensageiro de Hspa1 a/b nos grupos amostrais, expressa em *fold change*. Aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) na expressão gênica no grupo submetido à condição de hipóxia em relação ao grupo que recebeu a aplicação combinada de FBM e hipóxia. O grupo hipóxico apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Não existem diferenças significativas entre o grupo que recebeu a FBM e hipóxia e o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ , determinado por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

#### 4.4. Quantificação das proteínas carboniladas

Na **Figura 10**, quantificamos as proteínas carboniladas nos grupos experimentais. Observamos aumento do conteúdo destas proteínas no grupo submetido à hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Quando comparamos o grupo hipóxico com o grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia também observamos aumento ( $p \leq 0,01$ ) da quantidade das proteínas carboniladas. Após FBM, o grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia apresentou as mesmas quantidades observadas no grupo controle.

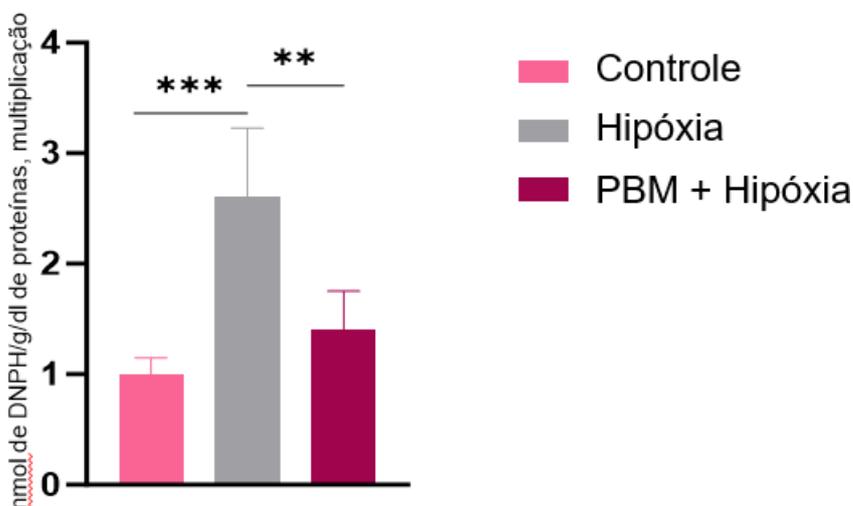


Figura 10. Quantificação de proteínas carboniladas nos grupos experimentais, expressa em *fold change*. Aumento do conteúdo destas proteínas no grupo submetido à hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao grupo controle. Ao comparar o grupo hipóxico com o grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia também existe aumento ( $p \leq 0,01$ ) da quantidade das proteínas carboniladas. Após FBM, o grupo submetido à combinação de FBM e hipóxia apresentou as mesmas quantidades observadas no grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ , determinado por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

#### 4.5. Quantificação das TBARS

Na **Figura 11**, empregamos o ácido tiobarbitúrico para determinar as TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico). Observamos aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) quando comparamos o grupo submetido à hipóxia e os demais grupos experimentais. Interessantemente, o grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia apresentou a restauração dos níveis de TBARS observado no grupo controle.

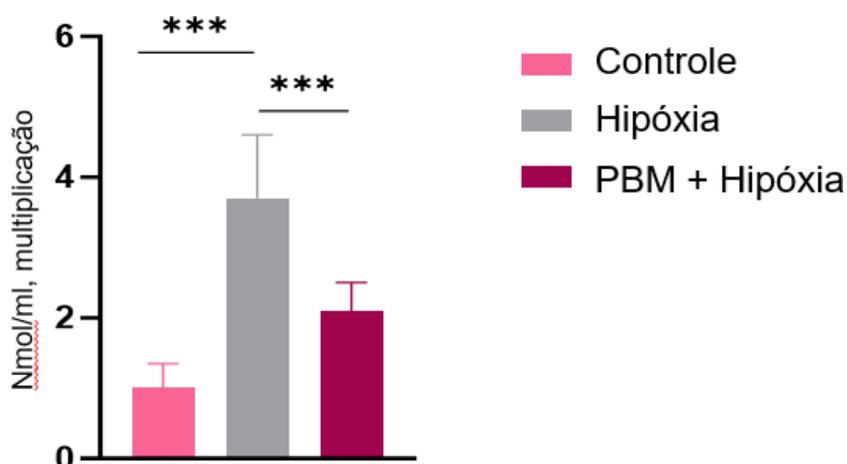


Figura 12. Determinação de TBARS nos grupos experimentais mostrada em *fold change*. Evidencia-se aumento significativo ( $p \leq 0,001$ ) quando comparado o grupo submetido à hipóxia e os demais grupos experimentais. O grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia apresentou a restauração dos níveis de TBARS observado no grupo controle (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ , determinado por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

#### 4.6. Atividade das enzimas antioxidantes

Analizamos também a atividade das enzimas antioxidantes cujas expressões gênicas foram mostradas na **Figura 8**. Em relação à expressão da enzima CAT (**Figura 12A**), nossos resultados não evidenciaram na atividade de CAT entre os grupos experimentais.

Na **Figura 12B**, evidenciamos aumento significativo de atividade de proteínas GPx no grupo que recebeu a combinação da FBM com hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) quando comparado com o grupo controle. Além disso, observamos também aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) de atividade desta enzima no grupo de FBM e hipóxia em relação ao grupo submetido somente à hipóxia. Não detectamos diferenças entre o grupo hipóxico e o grupo controle.

Em relação à enzima SOD (**Figura 12C**), observamos aumento da atividade desta proteína do grupo que recebeu FBM e hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) em comparação tanto com o grupo submetido apenas à hipóxia quanto com o grupo controle. Não foi observada significância ao comparar o grupo submetido à hipóxia e o grupo controle.

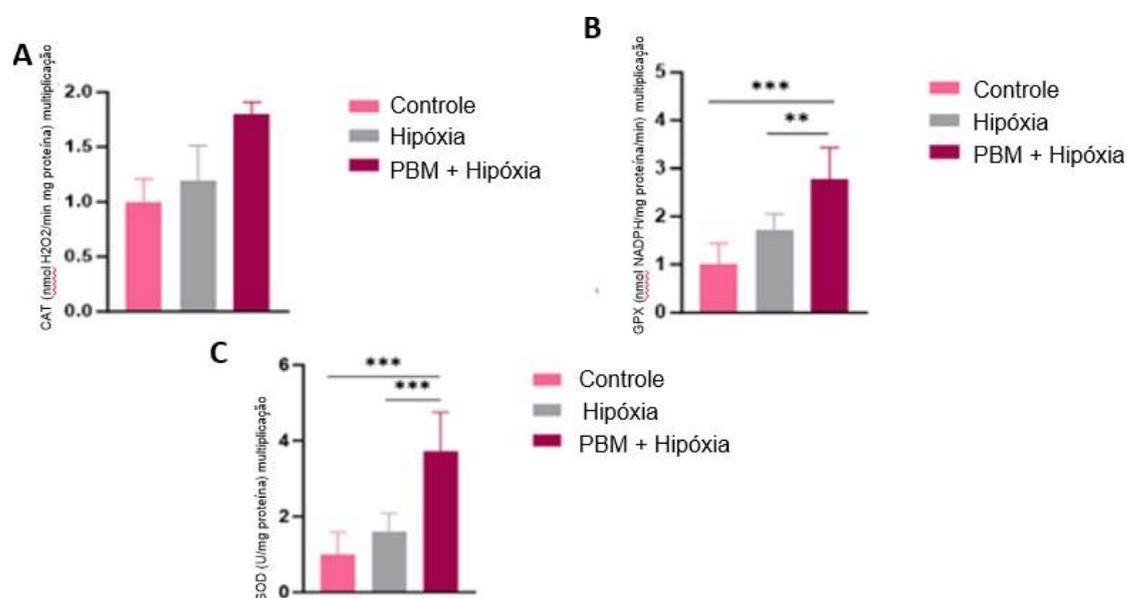


Figura 12A. Atividade da enzima antioxidante CAT, em *fold change*. Os resultados não evidenciaram diferença na atividade de CAT entre os grupos experimentais. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Figura 12B. Atividade da enzima antioxidante GPx apresentada como *fold change*. Aumento significativo de atividade de proteínas GPx no FBM+hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) quando comparado com o grupo controle. Também existe aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) do grupo de FBM e hipóxia em relação ao grupo submetido somente à hipóxia. Não há diferenças entre o grupo hipóxico e o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Figura 12C. Atividade da enzima antioxidante SOD, em *fold change*. Aumento da atividade no grupo que recebeu FBM + hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) em comparação tanto com o grupo submetido apenas à hipóxia quanto com o grupo controle. Não foi observada significância ao comparar o grupo submetido à hipóxia e o grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ . Médias determinadas por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

#### 4.7. Determinação de radicais livres

Na **Figura 13**, está representada a quantificação de radicais livres nos grupos experimentais. Observamos aumento significativo ao compararmos o grupo submetido à hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) com o grupo de controle e da terapia associada. O grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia apresentou níveis semelhantes aos encontrados no grupo controle.

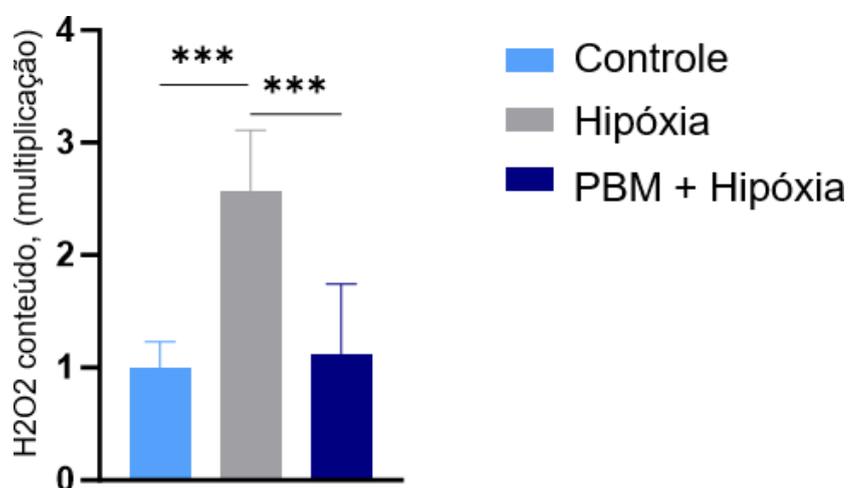


Figura 13. Quantificação de radicais livres expressa em *fold change*. Aumento significativo ao comparar o grupo submetido à hipóxia ( $p \leq 0,001$ ) com o grupo de controle e da terapia associada. O grupo que recebeu a combinação de FBM e hipóxia apresentou níveis semelhantes aos encontrados no grupo controle. (MED  $\pm$  EPM). \*  $p \leq 0,05$ , determinado por Teste ANOVA One-Way com Post-Hoc de Bonferroni.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo indica que a terapia de FBM, quando aplicada previamente ao insulto de hipóxia, potencialmente protege as células endoteliais contra danos oxidativos, especialmente pelo aumento da viabilidade celular, pela geração de enzimas antioxidantes e diminuição de marcadores de estresse celular.

Vários estudos sugerem que a terapia de FBM em células HUVECs aumenta a viabilidade e concentração de proteínas totais [105]. Um estudo que investigou os efeitos da irradiação do laser vermelho (660 nm; 63 J/cm<sup>2</sup>; 56 s/ponto) em células HUVECs revelou que a viabilidade e concentração de proteínas totais aumentaram [106], corroborando com nossos resultados de viabilidade celular, que também utilizou laser vermelho e comprimento de onda de 660nm, e um tempo de irradiação 60s, próximo ao utilizado no estudo citado.

A literatura traz várias evidências sobre o efeito da FBM na expressão das enzimas antioxidantes e biomarcadores de estresse oxidativo. Mostafavinia et al. (2021) [107] em estudo com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de ratos diabéticos submetidas à terapia de FBM, utilizando laser vermelho com comprimento de onda de 630nm, potência de 0,05W, tempo de irradiação de 46 segundos, densidade de energia de 1,2J/cm<sup>2</sup>, Diâmetro do feixe de laser, 1,56 cm, Área do feixe de laser, 1,91 cm<sup>2</sup> e Densidade de potência, 0,0261 W/cm<sup>2</sup>, observaram aumento da expressão de SOD1 e CAT. Os aumentos observados sugerem que as enzimas antioxidantes podem atuar prevenindo a formação de radicais livres ou espécies reativas nas células [105]. De fato, com a aplicação de terapia de FBM (890 nm, 80 Hz, 0,2 J/cm<sup>2</sup>) em células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) obtidas de ratos diabéticos implantadas em feridas, Tadi et al. (2022) observaram ações protetoras relacionadas aos processos inflamatório e proliferativo. Os resultados do estudo de Tadi et al. (2022) evidenciaram que a terapia de FBM induziu restauração da pele no local da lesão pela diminuição da resposta inflamatória. Além disso, foi verificado aumento do número de fibroblastos, de vasos sanguíneos e da expressão de genes de enzimas antioxidantes SOD1 e CAT [108], ressaltando o amplo espectro de ação da FBM.

Nossos resultados corroboram esses estudos, indicando aumento na expressão de RNAm das enzimas antioxidantes SOD1, CAT e GPx4 de HUVECs submetidas à combinação FBM e hipóxia. Tomazoni et al. (2019), observaram a capacidade da terapia de FBM com comprimento de onda de 810 nm (infravermelho), com 5 diodos, frequência de Saída contínua, saída óptica (por diodo): 100mW, tamanho do ponto (por diodo): 0,0364 cm<sup>2</sup>, densidade de potência (por diodo): 2,75W/cm<sup>2</sup>, energia (por diodo): 10J, densidade de energia (por diodo): 275J/cm<sup>2</sup>, período de exposição:100 segundos, em modular a atividade redox pelo aumento da atividade de SOD e CAT em experimento com jogadores de futebol de alto nível [109]. Entretanto, há evidências que a atividade dessas enzimas antioxidantes seja modulada de acordo com o comprimento de onda irradiado. Chen et al. (2022), observaram que a atividade das enzimas antioxidantes foi maior no grupo irradiado com comprimento de onda de 635 nm, enquanto o grupo irradiado com o comprimento de onda 808nm, não apresentou diferenças de atividade delas, reforçando a importância de escolha de parâmetros adequados, como comprimento de onda, nos efeitos terapêuticos da FBM. Os parâmetros utilizados foram: Comprimento de onda (nm): 635/808, modo de saída: contínuo, potência radiante média (mW)]: 100.200.300, área do ponto (cm<sup>2</sup>): 10, densidade de potência (mW/cm<sup>2</sup>): 10,20,40, densidade de energia (J/cm<sup>2</sup>): 1,5,3,6,12, perfil de feixe: redondo, ângulo de divergência do feixe (°): 90, [110]. Em nosso estudo o comprimento de onda usado foi de 660nm, próximo ao utilizado no estudo de Chen et al. (2022) e por Mostafavinia et al. (2021). Deste modo, o aumento na expressão de mRNA e atividade de enzimas antioxidantes em células HUVECs expostas à hipóxia, em nosso experimento, sugere que a FBM induz um estado antioxidante nas células irradiadas.

Ailioaie & Litscher (2020), em estudo para verificar ação da curcumina e fotobiomodulação na hepatite viral crônica e carcinoma hepatocelular, observaram aumento das proteínas antioxidantes SOD, CAT e GPx, foi utilizado laser azul de LEDs 420–430 nm, com 3 J/cm<sup>2</sup> [111]. Em nossos resultados e evidencia a capacidade da FBM, nos parâmetros utilizados são distintas do estudo acima, contudo conseguiram alcançar semelhante resultado em promover o aumento dessas proteínas na situação de hipóxia, uma vez que essas proteínas são fundamentais para a promoção de atividade antioxidante e de neutralização de radicais livres. Assim observamos que em alguns casos diferentes parâmetros tem a capacidade de alcançar resultados próximos. Os níveis aumentados de expressão gênica e atividade de SOD e GPx,

além de níveis mais baixos de radicais livres no grupo FBM + hipóxia (em comparação ao grupo hipóxia e ao grupo controle) corroboram os efeitos benéficos da terapia de FBM neste modelo *in vitro*. Em conjunto, nossos dados sugerem proteção celular pela terapia de FBM frente à hipóxia.

A proteína de choque térmico 70 (Hsp1a/b) é um regulador da resposta de cicatrização tecidual e da inflamação [112]. Utilizando modelo experimental de tendinite de Aquiles induzida por colagenase em ratos Wistar, Evangelista et al. (2020) observaram aumento na expressão de HSP70 em animais expostos à terapia com FBM com LED em comparação com animais controle e tendinite sem aplicação do LED. Os animais do grupo LED receberam a primeira irradiação 1 hora após a lesão. Um diodo emissor de luz (LED) de onda contínua de  $630 \pm 20$  nm, 300 mW, tamanho de ponto de 1 cm<sup>2</sup>, foi colocado em contato com a pele. Um ponto sobre o tendão foi irradiado por 30 segundos, fornecendo 9 J (9 J/cm<sup>2</sup>). A irradiação com LED foi realizada uma vez ao dia durante 7 dias, com energia total entregue de 63 J [112]. Em nosso estudo, o grupo FBM apresentou níveis reduzidos de RNAm de HSP70, contrastando com os resultados encontrados por esses autores. Além da diferença do aparelho utilizados, a FBM foi aplicada antes da indução do insulto. Assim, particularmente em nosso estudo, a terapia de FBM induziu diminuição deste marcador de estresse celular gerado pela hipóxia.

Outros marcadores também são utilizados para verificação de estresse oxidativo nas células, como a quantificação de proteínas carboniladas, geralmente aumentadas em situações de dano celular [113]; e as TBARS, que são utilizadas para avaliar os níveis de dano celular causados pelo estresse oxidativo [114]. Interessantemente, a quantificação de RNAm de Hsp1a/b, proteínas carboniladas e TBARS no grupo que recebeu FBM pré-hipóxia evidenciou que a terapia de FBM promoveu redução destes biomarcadores frente ao dano celular gerado pela hipóxia.

Observamos níveis elevados de DNPH em decorrência da hipóxia gerada em nosso protocolo experimental, entretanto, o grupo FBM e hipóxia apresentou níveis menores que o grupo hipóxia e semelhantes ao conteúdo de proteínas carboniladas observados no grupo controle. De fato, níveis menores de proteínas carboniladas foram observados em jogadores de futebol de alto nível tratados com FBM antes de teste de corrida progressiva. Demonstrado no estudo de Tomazoni et al. (2019). Nossos resultados, mesmo *in vitro*, sugerem que os baixos níveis de proteínas carboniladas podem indicar efeito protetor pela terapia de FBM [109].

Do mesmo modo, em um modelo experimental diferente, Scalon et al. (2022), observaram que a FBM (1 J; 100mW; 10 s; 880 nm; 6 x por semana) reduziu os níveis de TBARS em tecidos hepático e muscular de ratos Wistar cirróticos [115], como observados em nossos resultados. O fato do grupo submetido à FBM e hipóxia apresentar níveis semelhantes ao grupo controle sugere que a pré-exposição à FBM foi eficaz ao reduzir os níveis de TBARS.

Em nossa pesquisa quantificamos o nível de radicais livres para verificar uma possível redução decorrente do tratamento com terapia de FBM. Kim & Won (2022) avaliaram os efeitos da PBM pré-hipóxia na geração de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), utilizando módulos LED de 6 chips com comprimento de onda de 660 nm dispostos e combinados com controladores de resistência variável (Skycare, Gimpo, Coreia). A irradiância do dispositivo foi medida com um gravador de radiação (TES-1333R, TES Electronic Corp, Taipei, Taiwan) em uma sala escura. [116] e mostraram que a PBM foi capaz de prevenir a geração de EROs em modelo de hipóxia de epitélio de retina. Assim como em nosso modelo de hipóxia pré-tratado com PBM, esse grupo irradiado com FBM apresentou baixos níveis de EROs, enquanto o grupo de hipóxia não tratado apresentou níveis elevados, corroborando a ação da terapia de FBM vista em nosso estudo.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de nossos dados sugere que a FBM pode ser uma terapia eficaz para proteger as células endoteliais contra danos oxidativos em condições de hipóxia. A terapia de FBM pode aumentar a produção de enzimas antioxidantes, regular os níveis de proteínas carboniladas e diminuir a geração de radicais livres. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar a eficácia da FBM em condições de hipóxia, embora os resultados obtidos *in vitro* e a revisão bibliográfica realizada neste estudo sejam promissores neste sentido.

## **7. CONCLUSÃO**

A fotobiomodulação, quando aplicada pré-hipóxia em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), aumentou a produção de enzimas antioxidantes e reduziu os níveis biomarcadores de estresse celular e a geração de radicais livres.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-660. doi: 10.1038/nm0603-653. PMID: 12778165.
2. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell.* 2002;1(3):219-227. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00046-4. PMID: 12086848.
3. Daiber, A.; Steven, S.; Weber, A.; Shuvaev, V.V.; Muzykantov, V.R.; Laher, I.; Li, H.; Lamas, S.; Münzel, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1591–1619.
4. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 Sep 7;20(18). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6769656/>
5. Morin KT, Tranquilo RT. Modelos in vitro de angiogênese e vasculogênese em gel de fibrina. 2013 *Exp Cell Res* 319:2409–2417.
6. Lerman, A.; Zeiher, A.M. Endothelial function: Cardiac events. *Circulation* 2005, 111, 363–368.
7. Dauphinee, S.M.; Karsan, A. Progress in Inflammation Research. In *Endothelial Dysfunction and Inflammation*; Springer Basel AG: Basel, Switzerland, 2010; p. 243.
8. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013, 9, 1057–1069.
9. Nicholson C, Kamali-Zare P, Tao L. Brain extracellular space as a diffusion barrier. *Computing and Visualization in Science.* 2011 Oct;14(7):309–25.
10. Bringel, Fabiana de Andrade. 2011. “Avaliação Morfofuncional de Pele Humana Conservada Em Glicerol e Submetida à Radiação Gama: Estudo Em Camundongos Atômicos,” 1–122. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-10082011-182943/es.php>.
11. Junqueira, L. C. & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica: Texto e Atlas*. Editora Guanabara Koogan.
12. Aird WC. Endothelial cells and the pathobiology of the vascular wall. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1): 5-39. doi: 10.1007/3-540-36031-6\_2. PMID: 16999234.
13. Pohl U, Busse R. The role of endothelial cells in the regulation of vascular tone. *Ann Rev Physiol.* 1991;53:431-443. doi: 10.1146/annurev.ph.53.030191.002243. PMID: 2038723.

14. Green DJ, O'Driscoll G, Joyner MJ, Cable T, Harris K. Regulation of the peripheral circulation. In: Tipton MJ, ed. *The Circulatory System in Human Physiology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2016: 83-102.
15. Matlung, Hanke L, Erik N T P Bakker, and Ed Vanbavel. 2009. "And Arterial Structure and Function." *Critical Care Medicine* 11.
16. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. Overview of hemostasis. In: *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 3-14.
17. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
18. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310-2.
19. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1015-22.
20. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
21. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*. 2006;86(1):279-367.
22. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms, and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011, 473, 298–307.
23. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med*. 2000, 6, 389–395.
24. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiological Reviews*. 2018 Jan;98(1):3–58.
25. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci*. 2013, 9, 1057–1069.
26. Daiber, A.; Steven, S.; Weber, A.; Shuvaev, V.V.; Muzykantov, V.R.; Laher, I.; Li, H.; Lamas, S.; Münzel, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol*. 2017, 174, 1591–1619.
27. Lerman, A.; Zeiher, A.M. Endothelial function: Cardiac events. *Circulation* 2005, 111, 363–368.
28. Dauphinee, S.M.; Karsan, A. Progress in Inflammation Research. In *Endothelial Dysfunction and Inflammation*; Springer Basel AG: Basel, Switzerland, 2010; p. 243.
29. Szewczyk, A.; Jarmuszkiewicz, W.; Koziół, A.; Sobieraj, I.; Nobik, W.; Łukasiak, A.; Skup, A.; Bednarczyk, P.; Drabarek, B.; Dymkowska, D.; et al. Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol. Rep*. 2015, 67, 704–710.
30. Kwan, H.-Y.; Huang, Y.; Yao, X. TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis*. 2007, 1772, 907–914.

31. Tran, Q.-K.; Ohashi, K.; Watanabe, H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2000, 48, 13–22.
32. Bhutta BS, Alghoula F, Berim I. Hypoxia [Internet]. StatPearls Publishing; 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482316/>
33. Hantzidiamantis PJ, Amaro E. Physiology, Alveolar to Arterial Oxygen Gradient (Aa Gradient) [Internet]. Nih.gov. StatPearls Publishing; 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545153/>
34. Neil R MacIntyre. Tissue Hypoxia: Implications for the Respiratory Clinician. *Respir Care* 2014;59(10):1590 –1596.
35. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, and Keith B (2006) HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20:557–570.
36. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical Agnieszka Loboda\*, Alicja Jozkowicz, and Jozef Dulak\*
37. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510–5514.
38. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) Qingdong Ke and Max Costa Nelson Institute of Environmental Medicine, New York University, School of Medicine, Tuxedo, New York Received May 25, 2006.
39. Reyes H, Reisz-Porszasz S, and Hankinson O (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science (Wash DC)* 256:1193–1195.
40. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, and Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the subunit. *J Biol Chem* 272:11205–11214.
41. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8:588–594.
42. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, et al. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92:2260–2268.
43. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, and Poellinger L (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature (Lond)* 414:550–554.
44. Janaszak-Jasiecka A, Siekierzycka A, Płoska A, Dobrucki IT, Kalinowski L. Endothelial Dysfunction Driven by Hypoxia—The Influence of Oxygen Deficiency on NO Bioavailability. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Jul 3;11(7):982. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8301841/>.

45. Momboull JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1): 61-74.
46. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105(5): 546-9.
47. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78(6): 915-8.
48. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(8): 1873-81.
49. Fukuto JM, Wink DA. Nitric oxide (NO): formation and biological roles in mammalian systems. *Met Ions Biol Syst* 1999; 36: 547-95.
50. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105(5): 546-9.
51. Stowe DF, Camara AKS. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009 Jun;11(6):1373–414.
52. Hagen T. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1 $\alpha$ : The Balance Tips. 2012 Oct 9 [cited 2023 May 30];2012:1–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3474226/>
53. Khan I, Arany P (2015) Biophysical approaches for oral wound healing: emphasis on photobiomodulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4(12):724–737.
54. Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2006 283-8.
55. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2008 19-24. doi: 10.1089/pho.2007.2119.
56. Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, Silva JA Jr, Costa MS. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1 $\beta$  levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97. doi: 10.1007/s10753-008-9064-4.
57. Bortone F, Santos HA, Albertini R, Pesquero JB, Costa MS, Silva JA Jr. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2008 206-10. doi: 10.1016/j.intimp.2007.09.004.
58. Mafra de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva JA Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta (2)-

- adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med*. 2009 68-74. doi: 10.1002/lsm.20735.
59. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, Silva JA Jr, Salgado MA, Aimbire F, Albertini R. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med*. 2010 553-8. doi: 10.1002/lsm.20896.
  60. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R. Low-level laser therapy (LLLTT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011 85-94. doi: 10.1007/s10103-010-0811-z.
  61. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010 575-85. doi: 10.1038/nrc2894.
  62. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol*. 2011 423-8.
  63. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg*. 2012 118-48. doi: 10.1089/pho.2011.3142.
  64. Karu T (2010) Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg* 28(2):159–160.
  65. Amaroli A, Benedicenti A, Ferrando S, Parker S, Selting W, Gallus L, Benedicenti S (2016) Photobiomodulation by infrared diode laser: effects on intracellular calcium concentration and nitric oxide production of *Paramecium*. *Photochem Photobiol* 92(6):854–862.
  66. Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR (2016) Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Sci Rep* 6:33719.
  67. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol* 6:260–271.
  68. De Loura SC, Silva Dde F, Deana AM PRA, Souza AP, Gomes MT et al (2015) Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. *PLoS One* 10:e0122042.
  69. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D (1994) Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 14(4):347–354.
  70. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR (2013) Low-level laser (light) therapy (LLLTT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg* 32:41–52.

71. Lapchak PA, De Taboada L (2010) Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. *Brain Res* 1306:100–105.
72. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, David Baxter G (2004) Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train* 39(3): 223–229.
73. Amaroli A, Agas D, Laus F, Cuteri V, Hanna R, Sabbieti MG, Benedicenti S (2018) The effects of photobiomodulation of 808 nm diode laser therapy at higher fluence on the in vitro osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Front Physiol* 9: 123. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00123>.
74. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Diversity of Genomes and the Tree of Life. Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. 2002; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26866/>.
75. KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context to new data about multiple role of ATP. *Photomed Laser Surg* v.28, n.2, p.159–160. 2010.
76. GRYKO, Ł. et al. The concept of the set to objectification of LLLT exposure. *Proc. of SPIE: laser technology*. p. 8703. 2012.
77. KHANNA A.; SHANKAR, L. R.; KEELAN, M. H. Augmentation of the expression of the proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. *Cardiovasc Radiat Med* v.1, p.265–269. 1999.
78. RICCI, R. et al. Biomodulation with low-level laser radiation induces changes in endothelial cell actin filaments and cytoskeletal organization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* v.95, p. 6–8. 2009.
79. SCHINDL, A. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *British Journal of Dermatology*. v.148, p.334–336. 2003.
80. SZYMANSKA, J. et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol* v. 64, n.3, p. 387–391. 2013.
81. GÓRALCZYK, K. et al. Effect of LLLT on endothelial cells culture. *Lasers Med Sci*. v.30, n.1, p. 273–278. 2015.
82. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005 Jan;36(1):8-12. doi: 10.1002/lsm.20117. PMID: 15662631.
83. Bagheri HS, Mousavi M, Rezaabakhsh A, Rezaie J, Rasta SH, Nourazarian A, Avci ÇB, Tajalli H, Talebi M, Oryan A, Khaksar M, Kazemi M, Nassiri SM, Ghaderi S, Bagca BG, Rahbarghazi R, Sokullu E. Low-level laser irradiation at a high power intensity increased human endothelial cell exosome secretion via Wnt signaling. *Lasers Med Sci*. 2018 Jul;33(5):1131-1145. doi:

- 10.1007/s10103-018-2495-8. Epub 2018 Mar 30. Erratum in: *Lasers Med Sci.* 2020 Feb;35(1):295-296. PMID: 29603107.
84. Lander ES, Weinberg, RA. Genomics: journey to the center of biology. *Science.* 2000 Mar; 287(5459): 1777-82. doi: 10.1126/science.287.5459.1777.
85. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res.* 2006 May; 34(8): 2428-37. doi: 10.1093/nar/gkl287.
86. Brown TA. Chapter 1. The human genome. In: *Genomes.* 2.ed. Oxford: Wiley-Liss; 2002 [Acesso: 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>.
87. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P; Baltimore D, Darnell J. The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. In: *Molecular Cell Biology.* 4.ed. New York: W. H. Freeman; 2000. [Acesso: 10 nov 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
88. Caron H, Van Schaik B, Van der Mee M, Baas F, Riggins G, Van Sluis P. et al. The Human Transcriptome Map: Clustering of Highly Expressed Genes in Chromosomal Domains. *Science.* 2001 Feb; 291(5507):1289-92. doi: 10.1126/science.1056794.
89. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res.* 2006 May; 34(8): 2428-37. doi: 10.1093/nar/gkl287.
90. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. et al. *Fundamentos da biologia celular.* 3.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. ISBN 978-85-363-2513-2
91. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic. Sci.* 2006 Mar; 51(2): 253-65. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.
92. Aronson JK, Ferner, RE. Biomarkers-A general review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017 Mar; 76:9.23.1-17. doi: 10.1002/cpph.19.
93. Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006 May; 113(19): 2335-62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.482570.
94. Azuaje F, Devaux Y, Wagner D. Computational Biology for cardiovascular biomarker discovery. *Brief Bioinform.* 2009 Jul; 10(4): 367-77. doi: 10.1093/bib/bbp008.
95. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 165-77. doi: 10.1038/nrm2639.
96. Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2002 453-8.
97. Salomon, Tiago Boeira Hackenhaar, Fernanda Schäfer Alabarse E. A Atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD),

- glutathiona peroxidase (GPX) e a carbonilação de proteínas no coração de ratos machos com ou sem atividade reprodutiva. Salão de Iniciação Científica (19. : 2007 : Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2007.
98. Augustyniak A, Michalak K, Skrzydlewska E. A ação do estresse oxidativo induzido pelo etanol no sistema nervoso central (SNC). *Postepy Hig Med Dosw.* 2005; 59 :464-71.
  99. Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol.* 1999 889-900.
  100. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease patho-physiology. *Trends Mol Med.* 2001 345-50.
  101. Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE. Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol.* 2002 204-12.
  102. Griffiths L, Binley K, Iqbal S, Kan O, Maxwell P, Ratcliffe P, Lewis C, Harris A, Kingsman S, Naylor S. The macrophage - a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther.* 2000 255-62.
  103. Cesário JM, Brito RB, Malta CS, Silva CS, Matos YS, Kunz TC, Urbano JJ, Oliveira LV, Dalboni MA, Dellê H. A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in T24 human bladder cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 Mar;53(3):272-276. doi: 10.1007/s11626-016-0103-4. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27752923.
  104. Evangelista AN, Dos Santos FF, de Oliveira Martins LP, Gaiad TP, Machado ASD, Rocha-Vieira E, Costa KB, Santos AP, Oliveira MX. Photobiomodulation therapy on expression of HSP70 protein and tissue repair in experimental acute Achilles tendinitis. *Lasers Med Sci.* 2021 Aug;36(6):1201-1208. doi: 10.1007/s10103-020-03155-3. Epub 2020 Oct 10. PMID: 33037560.
  105. Terena SML, Mesquita-Ferrari RA, de Siqueira Araújo AM, Fernandes KPS, Fernandes MH. Photobiomodulation alters the viability of HUVECs cells. *Lasers Med Sci.* 2021 Feb;36(1):83-90. doi: 10.1007/s10103-020-03016-z. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32304000.
  106. Buzinari, T.C., de Moraes, T.F., Conceição-Filho, J.C. et al. Nitric oxide storage levels modulate vasodilation and the hypotensive effect induced by photobiomodulation using an aluminum gallium arsenide (AlGaAs) diode

- laser (660 nm). *Lasers Med Sci* 37, 2753–2762 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03551-x>.
107. Mostafavinia A, Ahmadi H, Amini A, Roudafshani Z, Hamblin MR, Chien S, Bayat M. The effect of photobiomodulation therapy on antioxidants and oxidative stress profiles of adipose derived mesenchymal stem cells in diabetic rats. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2021 Dec 5;262:120157. doi: 10.1016/j.saa.2021.120157. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34271236.
108. Bagheri Tadi, F., Noori Mougehi, S.M., Mostafavinia, A. et al. Photobiomodulation isolated or associated with adipose-derived stem cells allograft improves inflammatory and oxidative parameters in the delayed-healing wound in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lasers Med Sci* 37, 3297–3308 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03630-z>.
109. Tomazoni SS, Machado CDSM, De Marchi T, Casalechi HL, Bjordal JM, de Carvalho PTC, Leal-Junior ECP. Infrared Low-Level Laser Therapy (Photobiomodulation Therapy) before Intense Progressive Running Test of High-Level Soccer Players: Effects on Functional, Muscle Damage, Inflammatory, and Oxidative Stress Markers-A Randomized Controlled Trial. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 16;2019:6239058. doi: 10.1155/2019/6239058. PMID: 31827687; PMCID: PMC6885272.
110. Chen H, Cai Y, Sun S, Pan Z, Han Z, Liu P, Liu Y. Repair effect of photobiomodulation combined with human umbilical cord mesenchymal stem cells on rats with acute lung injury. *J Photochem Photobiol B*. 2022 Sep;234:112541. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112541. Epub 2022 Aug 11. PMID: 36029758.
111. Ailioaie LM, Litscher G. Curcumin and Photobiomodulation in Chronic Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 28;21(19):7150. doi: 10.3390/ijms21197150. PMID: 32998270; PMCID: PMC7582680.
112. Evangelista AN, Dos Santos FF, de Oliveira Martins LP, Gaiad TP, Machado ASD, Rocha-Vieira E, Costa KB, Santos AP, Oliveira MX. Photobiomodulation therapy on expression of HSP70 protein and tissue repair in experimental acute Achilles tendinitis. *Lasers Med Sci*. 2021

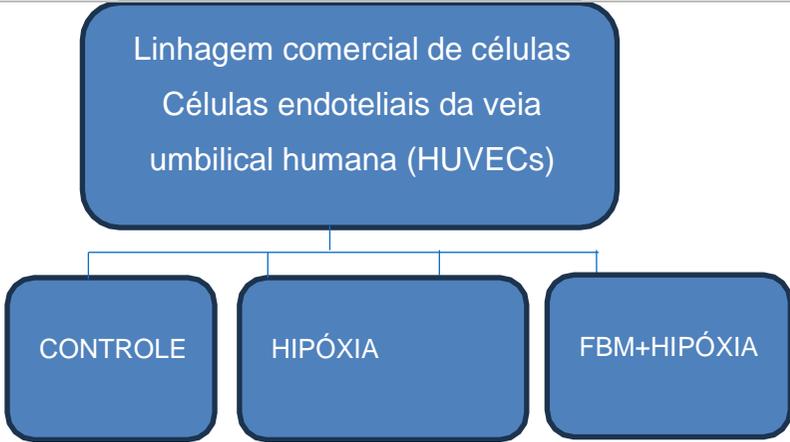
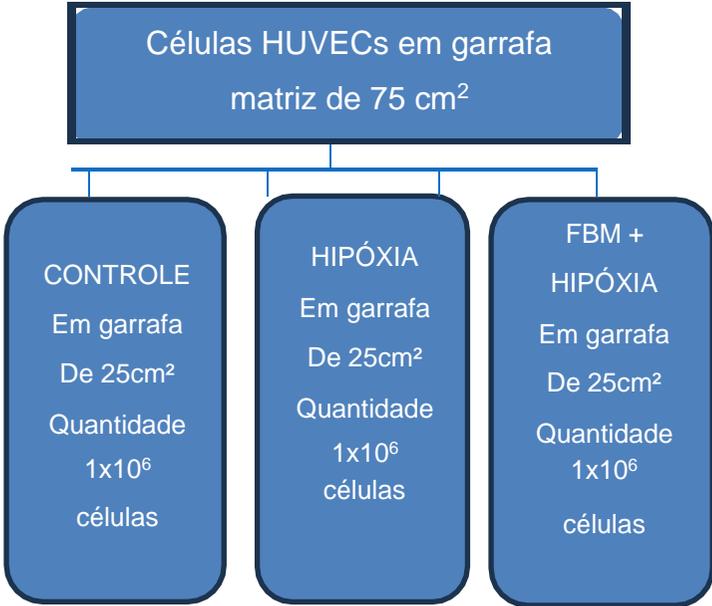
- Aug;36(6):1201-1208. doi: 10.1007/s10103-020-03155-3. Epub 2020 Oct 10. PMID: 33037560.
113. Lii CK, Lin AH, Lee SL, Chen HW, Wang TS. Oxidative modifications of proteins by sodium arsenite in human umbilical vein endothelial cells. *Environ Toxicol.* 2011 Oct;26(5):459-71. doi: 10.1002/tox.20572. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20196163.
114. Hou X, Yang S, Yin J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019 Jan 1;316(1):C104-C110. doi: 10.1152/ajpcell.00313.2018. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30485138.
115. Scalon D, Picada JN, de Sousa JT, da Silva AT, Colares JR, Marroni NAP. Photobiomodulation intervention improves oxidative, inflammatory, and morphological parameters of skeletal muscle in cirrhotic Wistar rats. *Lasers Med Sci.* 2022 Apr;37(3):1973-1982. doi: 10.1007/s10103-021-03458-z. Epub 2021 Nov 4. PMID: 34735658.
116. Kim J, Won JY. Effect of Photobiomodulation in Suppression of Oxidative Stress on Retinal Pigment Epithelium. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 8;23(12):6413. doi: 10.3390/ijms23126413. PMID: 35742861; PMCID: PMC9224180.

## **9. Anexos**

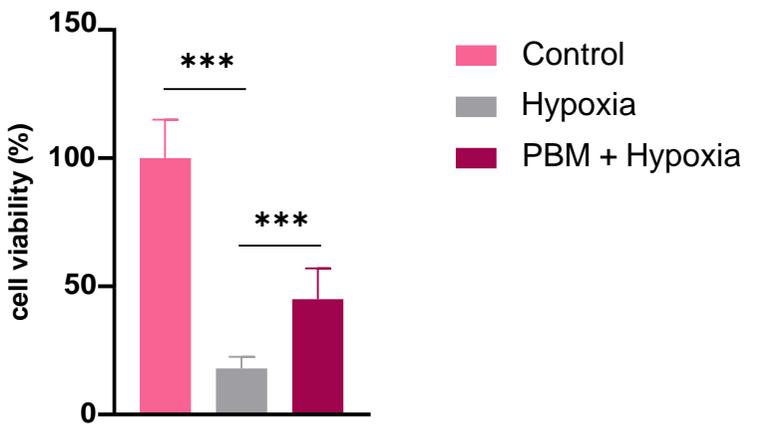
### **8.1. Checklist**

## CHECKLIST EM CULTURA CELULAR

Itens que devem ser incluídos no projeto. Sem essas informações, os avaliadores não serão capazes de avaliar o seu projeto/dissertação/tese.

| Tópico                   | Nº item | Recomendação  | Pag. que consta esse item no seu projeto |   |
|--------------------------|---------|---|--|---|
| <b>Desenho do estudo</b> | 1       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Descreva os grupos experimentais, incluindo grupo controle.</li> <li>• Descreva a procedência das células: cultura primária ou linhagem celular.</li> <li>• Para cultura primária: Incluir os dados do Comitê de Ética em Humanos ou do Comitê de Experimentação Animal dependendo de quem foi o doador</li> <li>• Explique como serão distribuídas as células nos diferentes grupos experimentais.</li> </ul> | 29, 30 e 31                              |  <p>As células serão caracterizadas pela expressão de CD31 APC e CD146 APC pelo método de citometria de fluxo.</p> |
| Tamanho da amostra       | 2a      | Especifique o número de células em cada grupo e o número total em cada experimento. Indique no fluxograma o número total de células por experimento e por amostra.  | 31                                       |   |

|                              |    |   |         |  |
|------------------------------|----|---|---------|--|
|                              | 2b | <p>Explique como o número de células foi definido para seu experimento/análise.<br/>(sugerido incluir a escolha do número de células com base nas análises a serem realizadas).</p> |         |  |
| <b>Critérios de controle</b> | 3  | <p>Descreva os critérios de controle utilizados para o experimento, incluindo percentual de células viáveis, condição de confluência (número de células/área).</p>                  | 30 e 31 | <p>As células foram descongeladas sob agitação, o conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico e centrifugadas. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e as células sedimentadas foram ressuspensa, mantidas a 37° C com 5 % de CO<sub>2</sub>.</p> <p>O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que a concentração de células antiga a confluência.</p> <p>Após proliferação as células foram tratadas com 5 mL de tripsina (0,5%) por 5 minutos e após o desprendimento celular foi acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O conteúdo celular foi transferido para um tubo graduado para 50 mL e centrifugado a 125 g por 5 minutos. Será realizado teste de viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripán e feita a contagem das células.</p> |

|           |   |  |    |  |
|-----------|---|--|----|--|
| Cegamento | 4 | Explicar se houve algum cegamento para contagem celular dos resultados ou alguma análise qualitativa (ex morfologia celular)entre os grupos experimentais. Descrever se o mesmo pesquisador prepara a amostra, semeia em wells, coleta os resultados e os analisa. | 39 |  <p>cell viability (%)</p> <p>150<br/>100<br/>50<br/>0</p> <p>***</p> <p>***</p> <p>Control<br/>Hypoxia<br/>PBM + Hypoxia</p>   |
| Desfechos | 5 | Defina claramente todos os desfechos que serão avaliados (ex: morte celular, proliferação, marcadores celulares e moleculares)   | 28 | <p>Foi avaliado:</p> <p>Em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) tratadas com FBM e submetidas à hipóxia foi avaliado:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- o efeito na viabilidade das células;</li> <li>- alterações de expressão gênica de componentes da via de transdução de estresse oxidativo;</li> <li>- as atividades das enzimas antioxidantes;</li> <li>- a expressão de biomarcadores de estresse celular e;</li> <li>- a geração de radicais livres.</li> </ul> |

|                             |    |  |         |  |
|-----------------------------|----|--|---------|--|
| Procedimentos experimentais | 6a | Condições de cultivo: temperatura, tipo de meio, suplementações (soro, fatores de crescimento, antifúngicos, antibióticos entre outros). | 30 e 31 | <pre> graph TD     A[As células foram descongeladas em água aquecida a 37°C sob agitação.] --&gt; B[O conteúdo foi transferido para um tubo cônico]     B --&gt; C[Foi centrifugado a 125 g por 5 minutos]     C --&gt; D[Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante]     D --&gt; E[As células sedimentadas foram ressuspensas em 12 mL de meio de cultura, e mantidas a 37°C com 5% de CO2.]     E --&gt; F[O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que a concentração de células chega-se a confluência.] </pre> <p>Tubo cônico contendo 9 mL de meio de cultura (RPMI Medium 1640, Vitrocell pH 7.4) 10 mmol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 2 mmol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina (Gibco, BRL, Life Technologies, USA), 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell).</p> |
|-----------------------------|----|--|---------|--|

Para cada análise, relate o número de células em cada grupo experimental e número de replicatas.

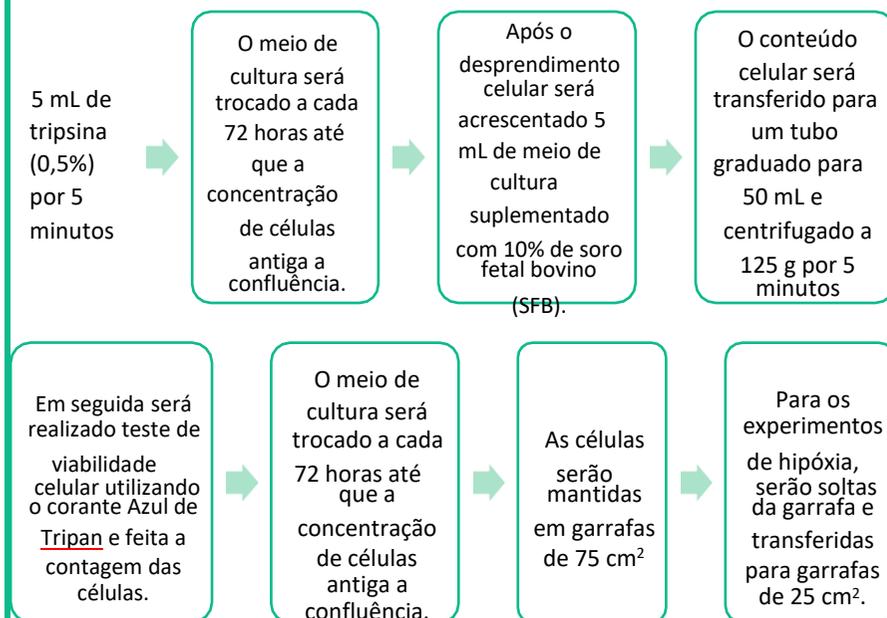
6b

Incluir detalhadamente a condição experimental (placa, quantidade de poços/placas, frascos de cultivo) e distribuição dos grupos experimentais.

Intervenção realizada (tratamento): quando e com que frequência.

30, 31, 32 e 33

Após proliferação as células foram tratadas com:



#### Fotobiomodulação (FBM)

Comprimento de onda: 660 nm

Potência radiante média (mW): 10 mW

Exposição radiante: 1,5 J/cm<sup>2</sup>

Tempo de aplicação: 60 segundos

Área irradiada: 0,04 cm<sup>2</sup>

Energia total: 0,6 J

FBM +  
HIPÓXIA

Indução de Hipóxia realizada artificialmente com a utilização de anaerobiose (AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido).

FBM + HIPÓXIA  
(Hipóxia pós aplicação de FBM)

HIPÓXIA

|                             |   |  |   |
|-----------------------------|---|--|---|
| <b>Métodos estatísticos</b> | 7 | Descreva em detalhes os métodos estatísticos utilizados em cada análise, incluindo o software utilizado. | 38<br><p>Teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis resultando em dados paramétricos para todos os grupos.</p> <p>Os resultados foram expressos em valores relativos para melhor compreensão;</p> <p>Para testar as diferenças entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste ANOVA <i>One-Way</i> com <i>Post-Hoc</i> de Bonferroni;</p> <p>Foi estabelecido o valor de <math>p &lt; 0,05</math> para significância estatística. As análises serão realizadas utilizando o software PRISM GraphPad, versão 10.0 para Windows.</p> |
|-----------------------------|---|--|---|

## Resultados

8

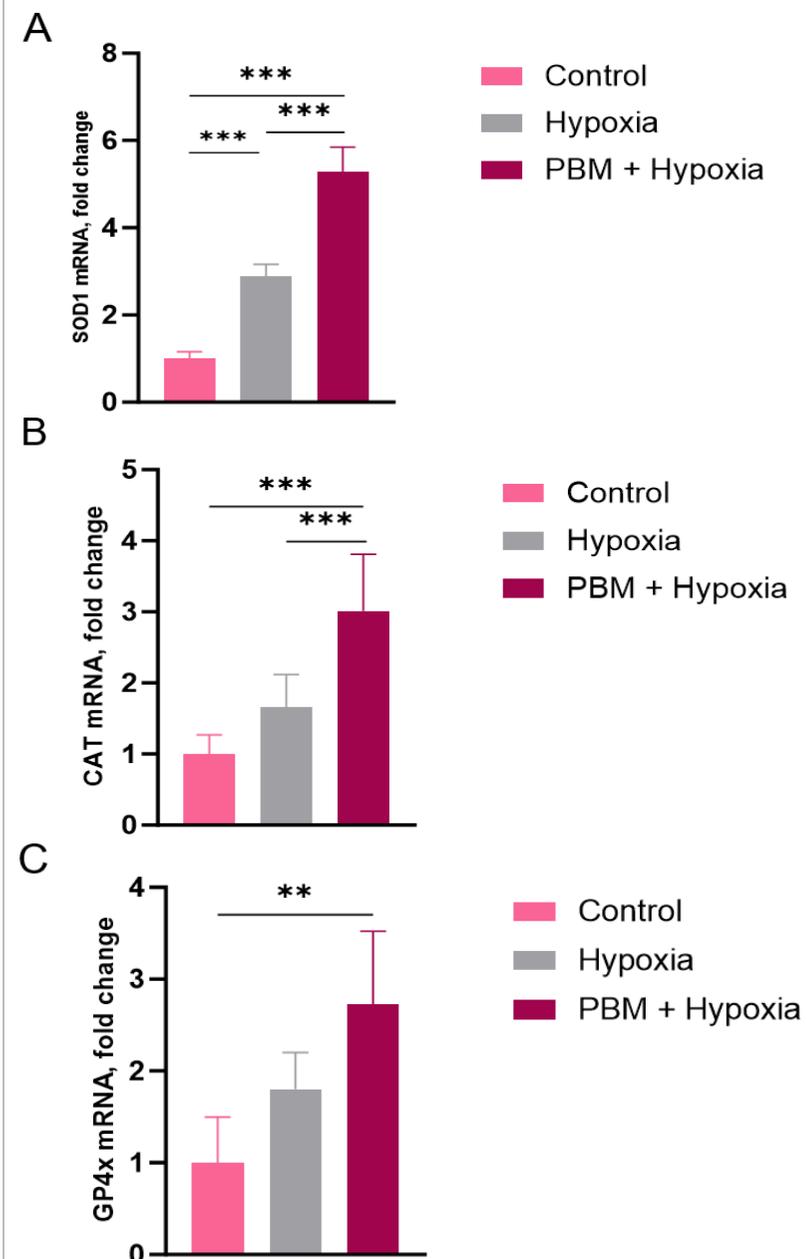
Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate:

- Incluir figuras e tabelas ilustrando os resultados encontrados bem como imagens quando aplicáveis.
- Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade, quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude)

Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança

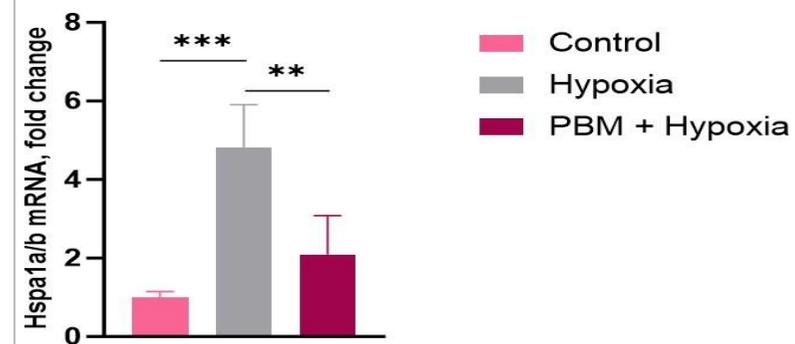
40

RNA das 3 principais enzimas antioxidantes:

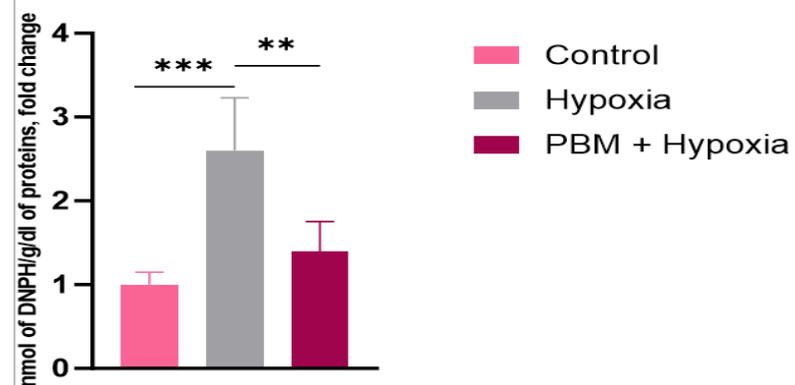


41 e 42

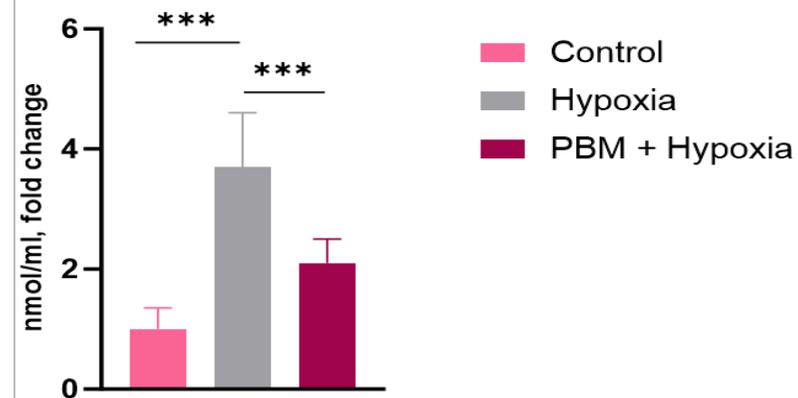
RNA da proteína de choque térmico 70:



Quantificação de proteínas carboniladas:

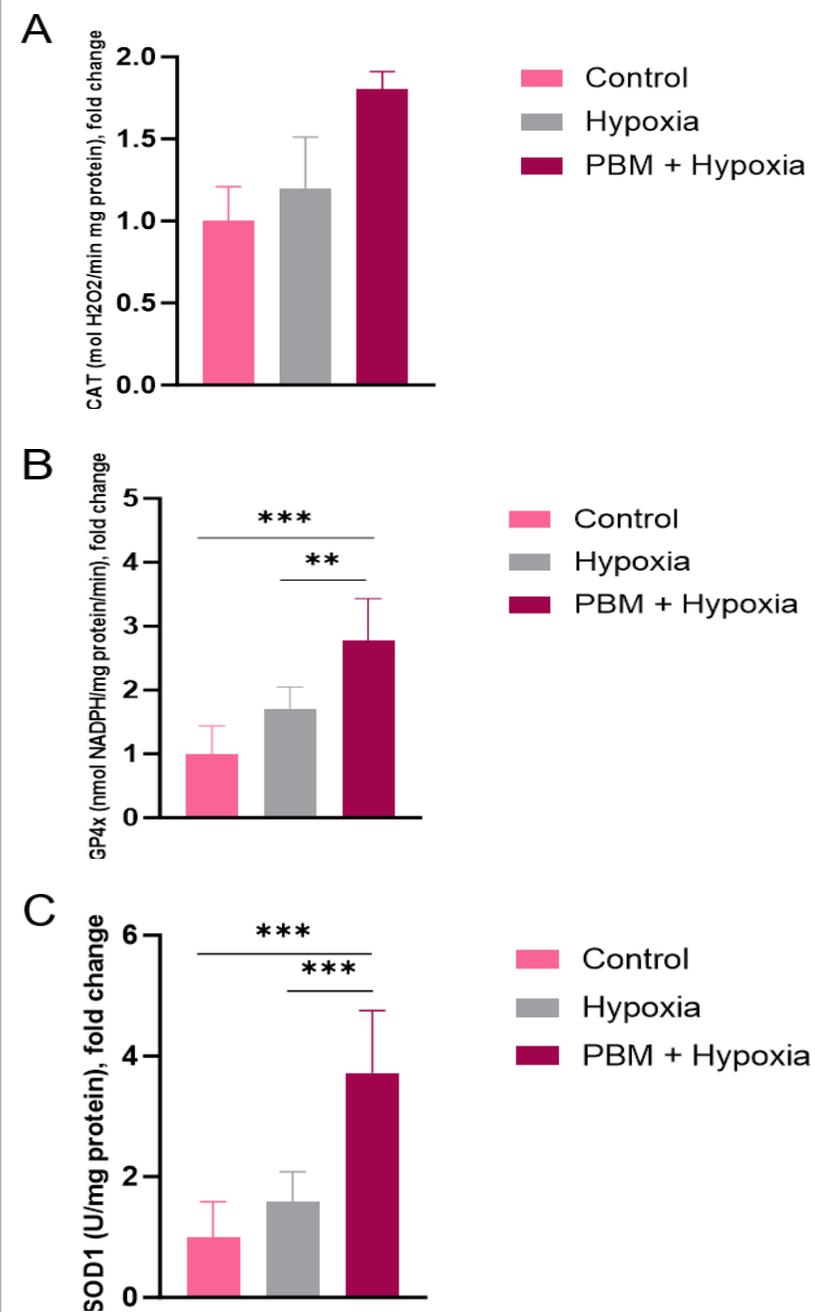


Quantificação de TBARS:



## Atividade das enzimas antioxidantes

43



44

Determinação de radicais livres:

