



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – BIOFOTÔNICA**

**MAÍRA DE SOUZA ARANHA BRAUNER**

**FOTOBIMODULAÇÃO E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DE RNA  
MESSAGEIRO ASSOCIADO À HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS  
ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA**

**São Paulo**

**2024**

**MAÍRA DE SOUZA ARANHA BRAUNER**

**FOTOBIMODULAÇÃO E SEUS EFEITOS NA EXPRESSÃO DE RNA  
MESSAGEIRO ASSOCIADO À HIPÓXIA E INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS  
ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina – Biofotônica da Universidade Nove de Julho, para obtenção do grau de mestre em Medicina - Biofotônica.

**Orientador:** Prof. Dr. Stella Regina Zamuner

**São Paulo**

**2024**

Brauner, Maíra de Souza Aranha.

Fotobiomodulação e seus efeitos na expressão de RNA mensageiro associado à hipóxia e inflamação em células endoteliais da veia umbilical humana. / Maíra de Souza Aranha Brauner. 2024.

86 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stella Regina Zamuner.

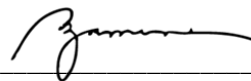
São Paulo, 18 de dezembro de 2024.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Maíra de Souza Aranha Brauner

Título da Dissertação: "Fotobiomodulação e seus efeitos na expressão de RNA mensageiro associado à hipóxia e inflamação em células endoteliais de veia umbilical humana".

Presidente: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus.

À minha família, que mesmo muitas vezes sem entender, nunca deixou de me apoiar, encorajar e torcer.

Ao meu querido noivo, Lucas, pelo suporte.

À minha orientadora, Professora Stella, que esteve me apoiando e orientando durante todo o processo.

Ao professor José Antônio Silva Júnior pela colaboração neste trabalho.

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

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

## RESUMO

As células endoteliais são células que revestem o interior dos vasos sanguíneos e linfáticos formando uma camada chamada endotélio, que, embora por muito tempo tenha sido considerado como uma camada inerte, hoje é reconhecido como um importante regulador das principais funções fisiológicas. Sob hipóxia, as células endoteliais respondem a estímulos químicos e secretam fatores que modulam as respostas adaptativas para lidar com a baixa disponibilidade de oxigênio e promover a sobrevivência e homeostase vascular. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da do pré-tratamento com a fotobiomodulação na transdução de sinais hipóxicos e inflamatórios em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Para isso utilizamos células HUVEC em três grupos experimentais, controle, células com hipóxia e células com hipóxia e tratamento com a fotobiomodulação e avaliamos o RNAm para as vias de hipóxia e inflamação. Nosso estudo evidenciou que a partir da análise de expressão de RNAm de genes envolvidos em processos de inflamação e adaptação à hipóxia, o pré-condicionamento com FBM foi capaz de atenuar a resposta inflamatória induzida pela hipóxia, evidenciada pela redução significativa das citocinas inflamatórias (IL1 beta, IL6 e TNF alfa) e pelo aumento nos níveis de IL10, uma citocina anti-inflamatória. Além disso, o tratamento com FBM também foi capaz de modular a expressão de genes reguladores da hipóxia, como HIF1 e EGLN1, sugerindo que o pré-condicionamento pode influenciar a resposta celular à baixa concentração de oxigênio.

**Palavras-chave:** Fotobiomodulação. Hipóxia. Inflamação. Endotélio.

## **ABSTRACT**

Endothelial cells are cells that line the inside of blood and lymphatic vessels forming a layer called the endothelium, which, although for a long time it was considered as an inert layer, today is recognized as an important regulator of the main physiological functions. Under hypoxia, endothelial cells respond to chemical stimuli and secrete factors that modulate adaptive responses to cope with low oxygen availability and promote survival and vascular homeostasis. Our objective was to evaluate the effects of pretreatment with photobiomodulation on the transduction of hypoxic and inflammatory signals in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). For this, we used HUVEC cells in three experimental groups, control, cells with hypoxia and cells with hypoxia and treatment with photobiomodulation and evaluated the mRNA for the hypoxia and inflammation pathways. Our study highlighted that, based on the analysis of mRNA expression of genes involved in inflammation and adaptation to hypoxia, preconditioning with FBM was able to attenuate the inflammatory response induced by hypoxia, as evidenced by the significant reduction of pro-inflammatory cytokines (IL1 beta, IL6, and TNF alpha) and the increase in IL10 levels, an anti-inflammatory cytokine. Moreover, FBM treatment was also able to modulate the expression of hypoxia-regulating genes, such as HIF1 and EGLN1, suggesting that preconditioning can influence the cellular response to low oxygen concentrations

**Keywords:** Photobiomodulation. Hypoxia. Inflammation. Endothelium.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Protocolo de fotobiomodulação .....	21
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Caracterização das células HUVECs por citometria de fluxo e marcadores celulares específicos .....	18
<b>Figura 2</b> – Procedimento experimental.....	20
<b>Figura 3</b> - Aparelho Twin FLEX-LASER, MMOptics Ltd (São Carlos, SP, Brasil).....	21
<b>Figura 4</b> - AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido). .....	22
<b>Figura 5</b> - Expressão de RNA mensageiro de HIF-1 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. i.....	26
<b>Figura 6</b> - Expressão de RNA mensageiro de EGLN1 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. i.....	27
<b>Figura 7</b> - Expressão de RNA mensageiro de EGLN3 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia.....	27
<b>Figura 8</b> - Expressão de RNA mensageiro de eNOS em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia.....	28
<b>Figura 9</b> - Expressão de RNA mensageiro de iNOS em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia.....	28
<b>Figura 10</b> - Expressão de RNA mensageiro de IL1 beta (A), TNF alfa (B), IL6 (C) e IL10 (D) em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia, e FBM e Hipóxia.. .....	30



## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CA	Cálcio
ECs	Células endoteliais
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FBM	Fotobiomodulação
HIF-1	Fator induzível por hipóxia-1
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível;
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
O <sub>2</sub>	Oxigênio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	FOTOBIMODULAÇÃO .....	11
1.2	CÉLULAS ENDOTELIAIS E ENDOTÉLIO .....	13
1.3	HIPÓXIA.....	14
1.4	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>18</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO .....	18
3.2	LOCAL.....	18
3.3.	AMOSTRA.....	18
3.4	CULTIVO DE CÉLULAS.....	19
3.5	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	19
3.6	PROTOCOLO DE FOTOBIMODULAÇÃO .....	21
3.7	INDUÇÃO DE HIPÓXIA.....	21
3.8	CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE CD11B, ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO .....	22
3.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	23
3.9.1	Tratamento do RNA total e Integridade das amostras.....	23
3.9.2	Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa.....	24
3.9.3	Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real – qPCR .....	24
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
	<b>ANEXO 1 - CHECKLIST .....</b>	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FOTOBIMODULAÇÃO

Laser é uma sigla em inglês que, traduzida para o português, significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. É mais conhecido como terapia com luz, fototerapia ou fotobiomodulação, sendo considerado um dos métodos terapêuticos mais antigos manipulados pelo homem, podendo ser classificados em dois tipos: lasers de alta potência, que são ablativos; e os de baixa potência, que são terapêuticos (1).

A terapia de fotobiomodulação é um tratamento não medicamentoso, indolor, não invasivo e sem efeitos colaterais, que tem como principais funções a analgésica, anti-inflamatória e de regeneração tecidual. Transforma energia luminosa em energia química, induzindo mudanças metabólicas, energéticas e funcionais, contribuindo assim para a elevação da resistência e da vitalidade das células (2). 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 (3).

Consiste em luz produzida artificialmente pela ativação de elétrons em repouso presentes em uma fonte de energia e um estímulo que proporciona bioestimulação ou bioinibição dependendo dos parâmetros dosimétricos e das condições do tecido a ser aplicado. Bioestimulação é um fenômeno em que ocorre uma reação fotoquímica em nível celular capaz de desencadear uma sequência de alterações celulares que resultam em, entre outros fatores, aumento do metabolismo e ativação mitocondrial, podendo estimular a regeneração celular (3,4). Este fenômeno é interessante para tratamento de diversas afecções em que ocorrem deterioração das estruturas celulares e sua utilização é segura pois não produz calor e nenhuma mudança brusca celular.

Moore et al. sugerem que os seguintes mecanismos estão por trás dos efeitos do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade celular: 1) a absorção de luz pelas enzimas mitocondriais, 2) a absorção de fótons pelos citocromos na cadeia

respiratória mitocondrial, 3) a produção de oxigênio singlete, que é uma espécie reativa de oxigênio capaz de causar danos aos sistemas vivos, uma vez que é um potente agente oxidante e suas moléculas alvo são principalmente proteínas e 4) a fotoativação dos canais de cálcio, o que aumenta a proliferação celular (5).

Dentre os benefícios da FBM estão a modulação de processos inflamatórios por estimular liberação de citocinas anti-inflamatórias; redução de marcadores do estresse oxidativo pelo aumento de mecanismos antioxidantes; aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), estimulação de cicatrização, angiogênese e evita morte de células e tecidos. Assim, possivelmente, na presença de inflamação, a FBM exerce uma ação anti-inflamatória e na ausência desta atua nos mediadores pró inflamatórios que irão remodelar os tecidos (6).

A FBM desencadeia através da luz alterações bioquímicas dentro das células, onde os fótons são absorvidos por componentes da cadeia respiratória da mitocôndria, sendo o citocromo c oxidase relatado como o principal fotorreceptor. O citocromo c oxidase é um cromóforo capaz de absorver a luz e excitar seus elétrons constituintes desencadeando uma cascata de reações bioquímicas. Tais reações levam a mudança no estado redox da célula desencadeando alterações que promovem estímulo na produção de ATP (Adenosina Trifosfato) e síntese de DNA e RNA. Em resposta ao estímulo desses fatores, uma série de reações secundárias ocorre através de novas cascatas de sinalização, resultando na modulação de fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  e VEGF; fator de transcrição nuclear (NF $\kappa$ -B) e interleucinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A modulação da expressão e secreção destas moléculas desenvolvem respostas macroscópicas no tecido irradiado, como por exemplo, resposta anti-inflamatória, promoção de angiogênese e proliferação celular, proporcionando benefícios na modulação da inflamação, cicatrização tecidual e regeneração muscular (2,7). A FBM pode agir diretamente nas células epiteliais para estimular a proliferação celular e melhora na reparação tecidual, alterando a organização do citoesqueleto endotelial após irradiação (8).

Vários grupos de pesquisa têm investigado o efeito da FBM em células endoteliais (Ecs). Em geral, o espectro de luz visível (vermelho 600 a 700nm) apresenta resultados benéficos na bioestimulação celular (5,9). E estudos sugerem que a terapia de FBM em células HUVECs aumenta a viabilidade e concentração de proteínas totais (10).

## 1.2 CÉLULAS ENDOTELIAIS E ENDOTÉLIO

As células endoteliais são células planas, de formato elíptico ou alongado, que se organizam de maneira contínua, formando uma camada que recobre o interior dos vasos sanguíneos e linfáticos. Estas estão dispostas em uma configuração adjacente umas às outras, com um espaço extracelular reduzido, seguindo a direção do fluxo sanguíneo (11). As células endoteliais formam o endotélio vascular e são a interface entre a parede do vaso e o sangue circulante. As células mantêm a homeostase e o tônus vascular, regulam a permeabilidade, produzem fatores de crescimento para o reparo tecidual, inibem a formação de trombos e participam da formação de novos vasos sanguíneos. Essas células também podem formar novos vasos sanguíneos *in situ* em locais onde não havia vasos anteriormente em um processo denominado vasculogênese. Em adultos os processos dependem da proliferação, migração e diferenciação celular e ocorrem em resposta a vias de sinalização específicas. Esses processos são cruciais para os processos de reparação tecidual como também para a promoção do crescimento celular e vascularização tecidual em casos de injúria (10).

O endotélio é um órgão dinâmico, metabolicamente ativo e mecanicamente adaptável, separando a parede do vaso do sangue e seus componentes e é central no processo de angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes. Esse processo é regulado por uma rede complexa de sinais moleculares, incluindo fatores de crescimento como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que estimula a proliferação e a migração das células endoteliais (12). 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 (13).

O sistema hemostático mantém um equilíbrio tênue entre a característica pró-coagulante e a anticoagulante, em condições normais, as células endoteliais permanecem ativas metabolicamente (Mesmo aparentando estar inerte) promovendo uma superfície ativa anticoagulada, proporcionando a passagem de hemácias, leucócitos e plaquetas um trajeto livre para todo o corpo. Qualquer alteração deste equilíbrio como processo inflamatório ou tensão de cisalhamento levando a uma lesão

endotelial, induz as células endoteliais a alterar o microambiente pró-trombótico e antifibrinolítico (4).

O aparecimento na corrente sanguínea das IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Proteína C Reativa (PCR) e (LDL-ox), são consideradas marcadores precoces de ativação endotelial e inflamação sistêmica (14).

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. 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. 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). 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 (Ca<sup>2+</sup>), do esgotamento dos estoques de Ca<sup>2+</sup> e de eventos de sinalização de entrada e saída de Ca<sup>2</sup> (12,15).

O endotélio desempenha papel protetor do sistema cardiovascular, liberando substâncias que modulam a contração do músculo liso vascular, a sua proliferação, a adesão e agregação plaquetária e controlam a hemostasia. Portanto, em condições de disfunção ou lesão desse tecido, há repercussão sobre a estrutura vascular, tecido adjacente e, por fim, sobre o sistema cardiovascular (16).

### 1.3 HIPÓXIA

A hipóxia, que é uma condição caracterizada pela redução do fornecimento de oxigênio para as células, 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 (17). 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) (11,18). 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. 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. 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). 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. O HIF-1 desempenha um papel essencial em várias respostas fisiológicas à hipóxia, como eritropoiese, glicólise e angiogênese, que ajudam a compensar rapidamente a deficiência de oxigênio (19–21).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A fotobiomodulação (FBM) é uma terapia que utiliza luz em comprimentos de onda específicos para induzir respostas biológicas em células e tecidos, promovendo regeneração, alívio da dor, e controle de inflamações. Estudos recentes têm evidenciado o potencial da FBM em modular vias de sinalização celular, especialmente aquelas relacionadas ao estresse e à adaptação celular sob condições adversas. Contudo, ainda existem lacunas significativas no entendimento dos mecanismos específicos pelos quais a FBM influencia a transdução de sinais hipóxicos, particularmente em células endoteliais, que desempenham um papel crucial na regulação da homeostase vascular e no desenvolvimento de diversas patologias.

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) são amplamente utilizadas como modelo de estudo para investigar respostas celulares e moleculares em situações de hipóxia, condição comumente observada em doenças cardiovasculares, complicações gestacionais e outras patologias sistêmicas. Em ambientes hipóxicos, essas células ativam vias de transdução de sinais mediadas por fatores como HIF-1 (fator induzido por hipóxia), que regulam a expressão de genes associados à sobrevivência celular e à adaptação ao baixo nível de oxigênio. Compreender como a FBM afeta essas vias pode abrir novas possibilidades terapêuticas para condições relacionadas à hipóxia.

Portanto, o presente estudo buscou investigar o impacto da fotobiomodulação na expressão de RNA mensageiro associados à hipóxia e inflamação em células endoteliais da veia umbilical humana fornecendo evidências experimentais que puderam elucidar os mecanismos pelos quais a FBM pode ser utilizada para mitigar os efeitos de ambientes hipóxicos em células endoteliais. Esses achados poderão contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes, não invasivas e com potencial de aplicação clínica ampla.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação na expressão de RNA mensageiro associados à hipóxia e a inflamação em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em células HUVEC submetidas a hipóxia e irradiadas com a FBM avaliamos:

- Alterações na expressão de RNA mensageiro envolvidos na hipóxia (genes HIF-1, EGLN1 e EGLN3).
- Alterações da expressão de RNA mensageiro envolvidos no processo inflamatório (genes e-NOS, iNOS, IL-1b, IL-6, IL-10 e TNF).

### 3 MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

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

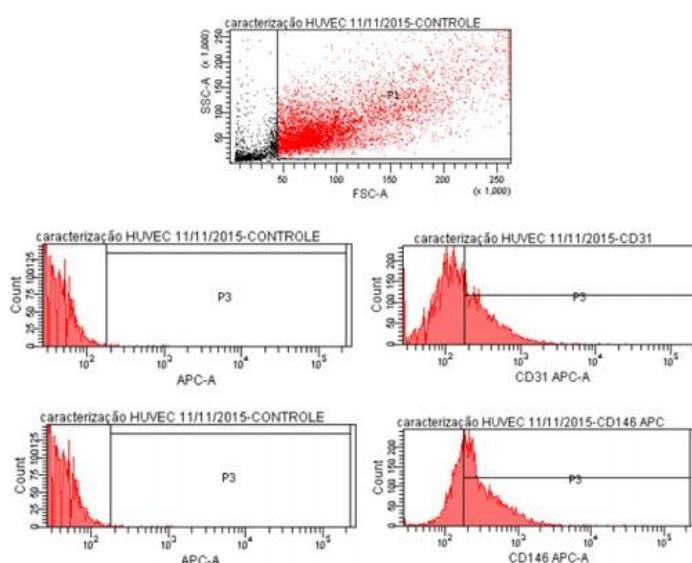
#### 3.2 LOCAL

Todo o cultivo celular foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Mestrado em Medicina 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 (ATTC, 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 1**).

Figura 1 - Caracterização das células HUVECs por citometria de fluxo e marcadores celulares específicos



### 3.4 CULTIVO DE CÉLULAS

As células foram descongeladas em água aquecida 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 serão ressuspensas em 12 mL de meio de cultura, e mantidas a 37° C com 5 % de CO<sub>2</sub>.

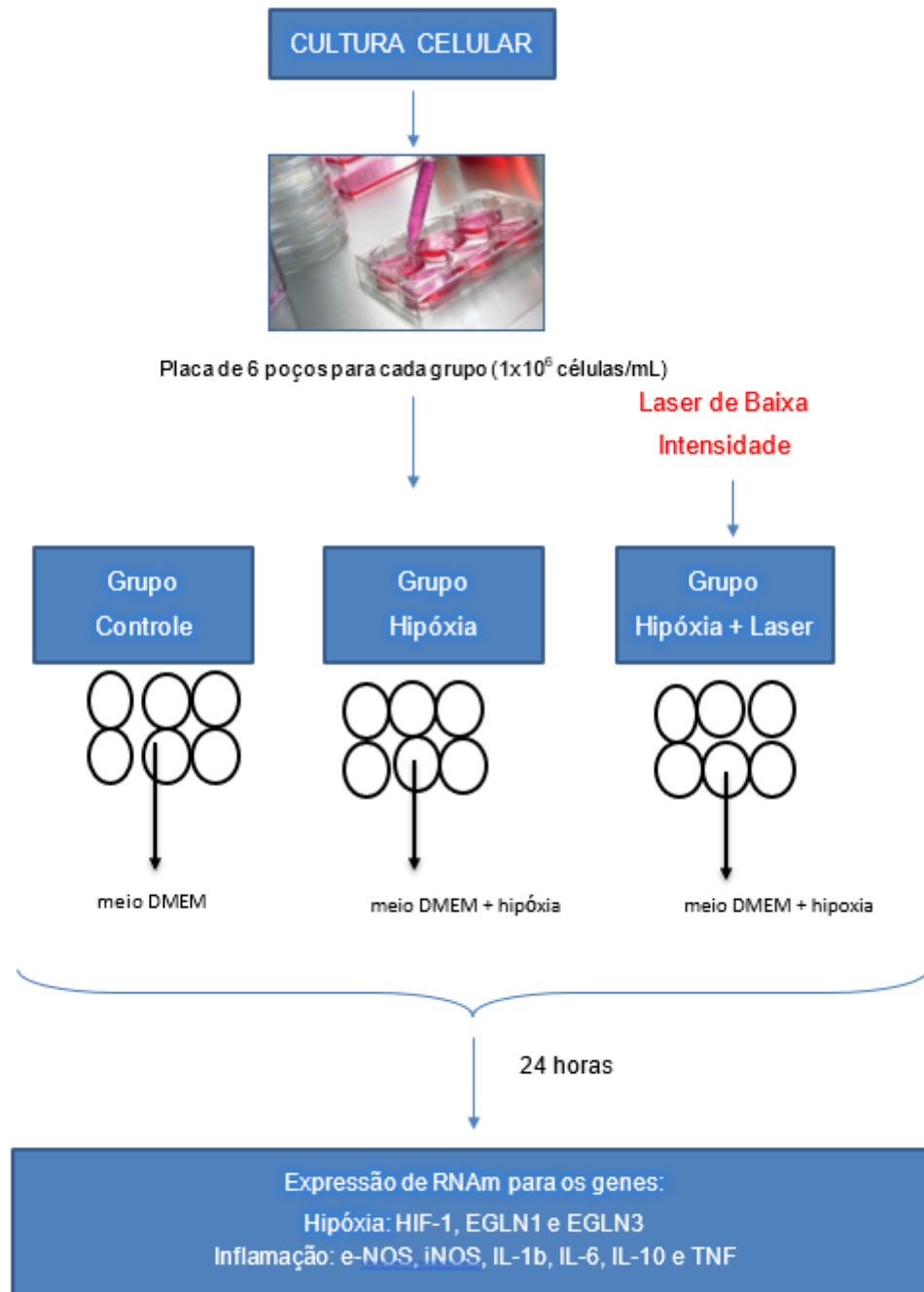
O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que as concentrações de células atingissem confluência. Após proliferação as células foram tratadas com 5 mL de tripsina (0,5%) por 5 minutos e após o desprendimento celular foi acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (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 corante Azul de Tripán e feita a contagem das células. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e, para os experimentos de hipóxia, foram soltas da garrafa e transferidas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup>.

### 3.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

As células HUVEC, 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> células cada uma nos seguintes grupos e conforme figura 2:

- *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.

Figura 2 – Protocolo experimental



Fonte: Elaborada pela autora (2024)

### 3.6 PROTOCOLO DE FOTOBIMODULAÇÃO

A FBM foi conduzida por meio de um aparelho Twin FLEX-LASER (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil; **Figura 3**), com os parâmetros apresentados a seguir:

Figura 3 - Aparelho Twin FLEX-LASER, MMOptics Ltd (São Carlos, SP, Brasil).



Tabela 1 - Protocolo de fotobiomodulação

Comprimento de onda	660 nm
Intensidade	10 mW
Densidade de energia	1,5 J/cm <sup>2</sup>
Tempo de aplicação	6 segundos
Área irradiada	0,04 cm <sup>2</sup>

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 cima 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 4**). 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.

Figura 4 - AnaeroGen, Oxoid, Cambridge, Reino Unido)



### 3.8 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE CD11B, ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO

Após o período de incubação de 24 horas de hipóxia (grupos Hipóxia e FBM + Hipóxia), as células foram incubadas com 4 mL de tripsina a 0,5% por 5 minutos a 37°

C. As células foram desaderidas (tripsina 0,5% durante 5 minutos a 37°C). A contagem de células foi executada com auxílio da câmera de Neubauer usando corante azul de Tripán (0,4%). Após a contagem, foram calculadas  $5 \times 10^5$  células para cada um dos grupos e acomodadas em tubos 12x75 mm. Na sequência foram

centrifugados a 500 g por 10 minutos e foi descartado seu sobrenadante ao final.

Foi acrescentado 100  $\mu$ L de tampão fosfato-salino (PBS, *phosphate buffered saline*, BD Pharmingen) com a finalidade de lavagem e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Posteriormente, foram acrescentados 100  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*, BD Pharmingen). A seguir, foram adicionados os anticorpos CD11b (detecção de moléculas para adesão de leucócitos), Anexina V (marcador de apoptose) e Iodeto de Propídio (PI, marcador de necrose).

Todos os tubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 500 g por 10 minutos, e os sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se 200  $\mu$ L de solução de PBS 1% AZIDA e a detecção da expressão destes receptores foram realizadas no citômetro de fluxo (Accuri C6, BD) imediatamente com o término do procedimento de marcação.

### 3.9 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 mistura, 200  $\mu$ L de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de água DEPC.

#### 3.9.1 Tratamento do RNA total e Integridade das amostras

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (NanoDrop Products, Wilmington, USA) sendo

que 1U A260 corresponde a 40ug de RNA/mL. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes ( $A_{260}/A_{230} \sim 1,8$ ) e de proteínas ( $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ ). 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  $MgCl_2$  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.

### **3.9.2 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  $MgCl_2$  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. 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 realização da PCR em tempo Real.

### **3.9.3 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). 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 µl de cDNA, foram adicionados 5 µl de Solução Fast Master Mix 2X (Applied Biosystems, EUA) e água suficiente para 10 µl 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 fluorescente atinja o limiar de detecção. A expressão dos genes foi normalizada pelo nível de expressão do gene *housekeeping* 18S RNA ribossômico, cuja expressão se mostrou 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.

### 3.10 Análise Estatística

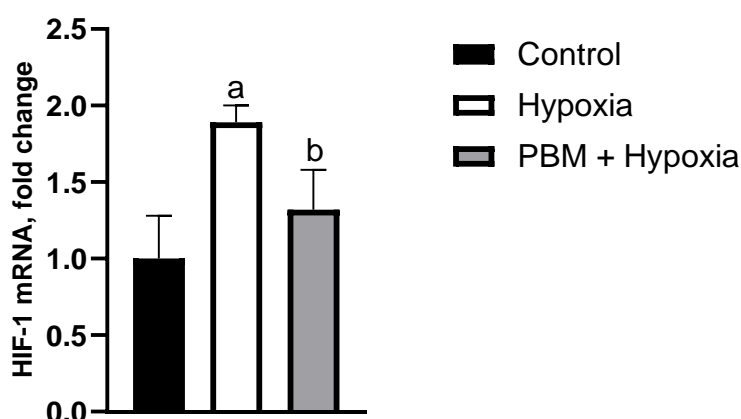
Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis resultando em dados paramétricos para todos os grupos. Os resultados foram expressos em valores relativos para melhor compreensão. Os dados foram apresentados com média e erro padrão da média (EPM). Para testar as diferenças entre 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

Neste estudo avaliamos, por meio de PCR quantitativo a expressão de RNAm de 9 genes envolvidos na inflamação e hipóxia em 3 grupos experimentais. Como diferencial, testamos a hipótese que o pré-condicionamento com FBM poderia alterar a transcrição de genes adaptativos à baixa concentração de O<sub>2</sub>.

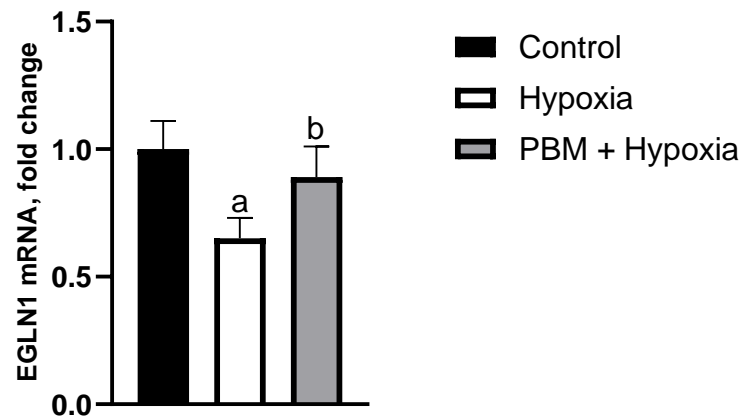
A expressão de RNAm de HIF-1 foi fortemente aumentada no grupo hipóxia comparando com o grupo controle. O pré-condicionamento com FBM diminuiu os níveis de RNAm de HIF1 em relação ao grupo hipóxia. Não foi observada diferença entre o grupo FBM+Hipóxia e o grupo controle (Fig. 5).

Figura 5 - Expressão de RNA mensageiro de HIF-1 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo Controle, a letra b representa diferença entre o grupo Hipóxia. A diferença estatística foi considerada significativa.



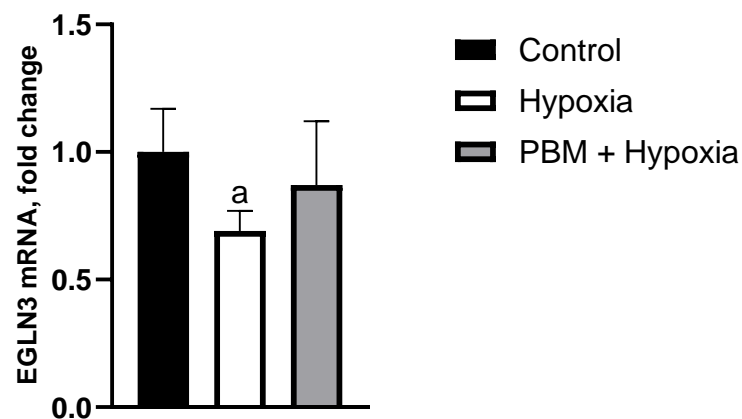
Os genes EGLN1 e EGLN3 codificam enzimas chamadas prolil-hidroxilases (PHD), que estão envolvidas na regulação da degradação do fator induzível por hipóxia (HIF). Quando os níveis de oxigênio são normais, as PHDs hidroxilam o HIF, marcando-o para degradação. Em condições de hipóxia, essa hidroxilação é inibida, permitindo que o HIF se acumule e ative a expressão de genes que ajudam a célula a se adaptar à baixa disponibilidade de oxigênio. Em nosso estudo, a expressão de RNA mensageiro de EGLN1 diminuiu com hipóxia em relação ao grupo controle. No entanto, quando a FBM foi aplicada, os níveis de RNAm de EGLN1 foram maiores em relação ao grupo hipóxia, sendo restabelecidos para valores semelhantes ao grupo controle (Fig. 6).

Figura 6 - Expressão de RNA mensageiro de EGLN1 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo Controle, a letra b representa diferença entre o grupo Hipóxia. A diferença estatística foi considerada si



Em relação à expressão de EGLN3, o grupo hipóxia apresentou níveis de RNAm menores que o grupo controle. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre o grupo que recebeu a FBM e os demais grupos experimentais (Fig. 7).

Figura 7 - Expressão de RNA mensageiro de EGLN3 em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo controle. A diferença estatística foi considerada significativa caso  $p \leq 0,05$ .

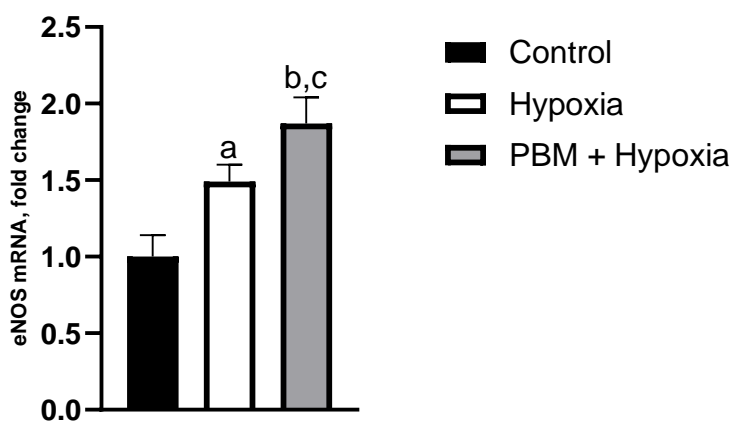


As enzimas sintetases de óxido nítrico (NOS) são responsáveis pela produção

de óxido nítrico (NO), um gás endógeno que possui ação vasodilatadora. Na hipóxia, a regulação do NO é crucial para a adaptação celular à baixa disponibilidade de oxigênio.

A expressão de RNAm de NOS endotelial e induzida foi avaliada em nosso estudo. A NOS endotelial apresentou aumento de expressão de RNAm em condição de hipóxia (grupo Hipóxia) em relação ao grupo controle. Entretanto, a FBM resultou em aumento significativo de RNAm de eNOS em comparação com os demais grupos experimentais (Fig. 8).

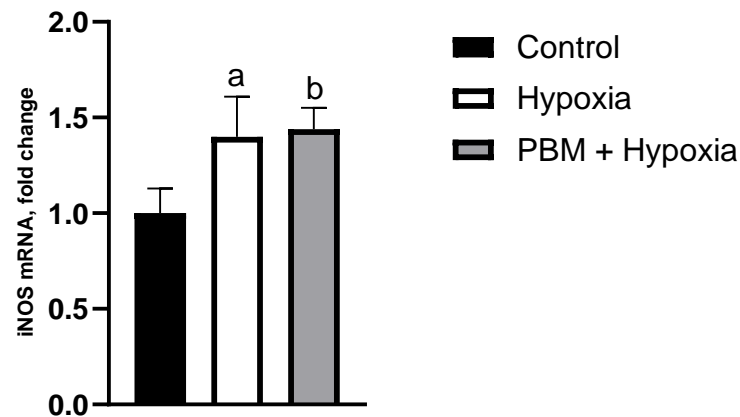
Figura 8 - Expressão de RNA mensageiro de eNOS em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo Controle, a letra b representa diferença entre o grupo Hipóxia e a letra c representa diferença entre o grupo FBM+Hipóxia e o grupo controle. A diferença estatística foi considerada significativa caso  $p \leq 0,05$ .



Da mesma forma, a expressão de iNOS foi aumentada nos grupos que foram submetidos à indução de hipóxia em relação ao grupo controle. Entretanto, a aplicação de FBM não resultou em alteração na expressão de RNAm de iNOS em relação ao grupo hipóxia (Fig. 9).

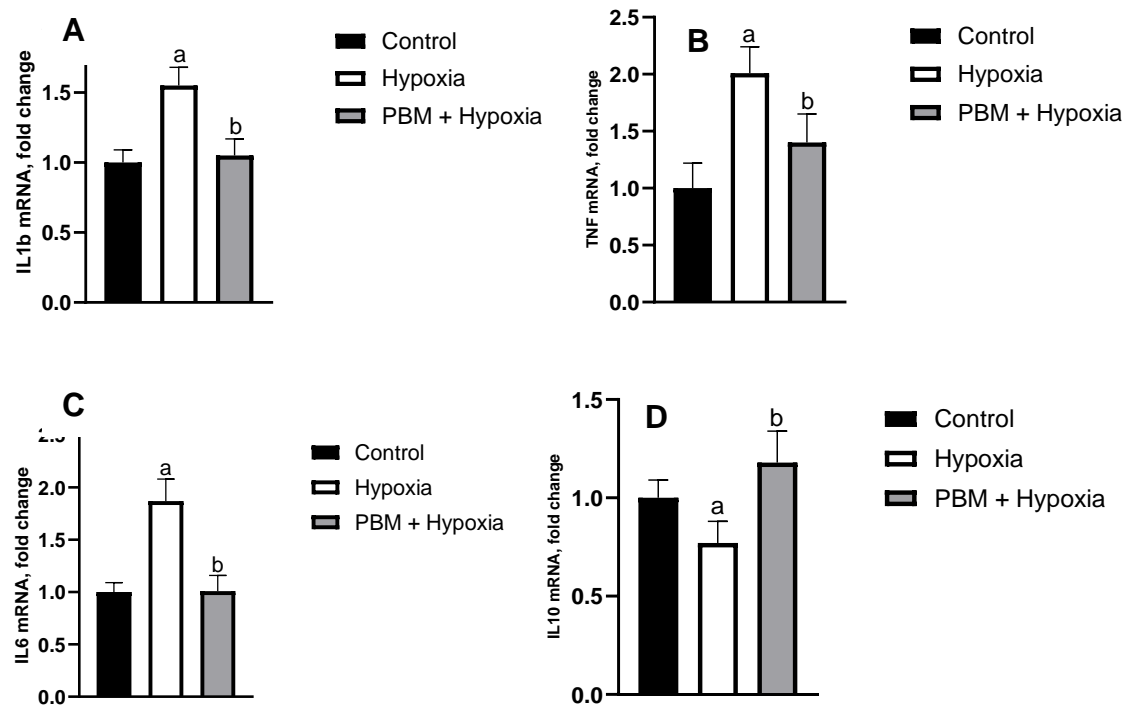
Figura 9 - Expressão de RNA mensageiro de iNOS em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia

e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo Controle, a letra b representa diferença entre o grupo Hipóxia. A diferença estatística foi considerada significativa caso  $p \leq 0,05$ .



A expressão de RNAm de citocinas inflamatórias (IL1 beta, IL6 e TNF alfa) e antiinflamatórias (IL10) também foi avaliada em nosso estudo. A expressão de IL1 beta mostrou-se aumentada significativamente após a indução de hipóxia (Fig. 10 A). O mesmo comportamento foi observado em relação à expressão de IL6 e TNF alfa (Fig. 10 B e C, respectivamente). O pré-condicionamento com FBM resultou em níveis mais baixos destas citocinas em relação ao grupo hipóxia. O tratamento prévio com FBM diminuiu os níveis de RNAm das citocinas pró-inflamatórias a níveis semelhantes aos observados no grupo controle (Fig.10 A, B e C). Por outro lado, a expressão de IL10 mostrou-se diminuída após a hipóxia, entretanto, o pré-condicionamento com FBM elevou a expressão de RNAm de IL10 no grupo FBM+Hipóxia em relação ao grupo hipóxia (Fig. 10 D).

Figura 10 - Expressão de RNA mensageiro de IL1 beta (A), TNF alfa (B), IL6 (C) e IL10 (D) em células HUVEC nos grupos Controle, Hipóxia, e FBM e Hipóxia. A letra a representa diferença entre o grupo Controle, a letra b representa diferença entre o grupo Hipóxia. A diferença estatística foi considerada significativa caso  $p \leq 0,05$ .



## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a expressão de RNA mensageiro de genes chave envolvidos nas respostas celulares à hipóxia e à inflamação em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) expostas a condições de hipóxia e ao pré-condicionamento com terapia de fotobiomodulação antes da hipóxia. Nossos resultados revelaram importantes dados em relação a interação entre vias adaptativas à baixa oxigenação e a potencial modulação desses mecanismos pelo pré-condicionamento com a terapia de fotobiomodulação.

Na hipóxia, o fluxo sanguíneo é interrompido, limitando a formação de trifosfato de adenosina (ATP) devido a alterações mitocondriais na cadeia de transporte de elétrons e à falha de bombas iônicas, iniciando vias metabólicas anaeróbicas (22). Consequentemente, há uma diminuição nas defesas antioxidantes, pH e troca iônica. Essas alterações tornam os transportadores dependentes de ATP inviáveis, levando potencialmente à disfunção mitocondrial e à morte celular. O HIF-1 é um dos principais reguladores da resposta celular à hipóxia. Como esperado, a expressão de RNAm de HIF-1 foi significativamente aumentada no grupo exposto à hipóxia, indicando a ativação dessa via adaptativa em resposta à deficiência de oxigênio. Esse aumento é consistente com a literatura, que descreve o papel do HIF-1 na mediação de respostas celulares essenciais à adaptação a condições de oxigênio limitado, como a indução da angiogênese e a modulação do metabolismo celular. De maneira estatisticamente significativa o pré-condicionamento com FBM reduziu a expressão de HIF-1 no grupo FBM+Hipóxia em comparação ao grupo Hipóxia, sugerindo um efeito de fotobiomodulação sobre a ativação de HIF-1, possivelmente atenuando a resposta adaptativa exagerada à hipóxia (3,17,20). Semelhante ao nosso estudo, em fibroblastos de esclera humana sob hipoxia, o tratamento com a fotobiomodulação a 660 nm promoveu a síntese de colágeno por meio da regulação negativa da expressão de HIF-1 $\alpha$  sem fotodano às células (23). Ainda, foi demonstrado que o acúmulo de HIF-1a em tecidos nervosos danificados foi suprimido após tratamento com fotobiomodulação a 660 nm. No mesmo estudo, o tratamento com a fotobiomodulação também reduziu a expressão de HIF-1a em macrófagos, que coordenam a inflamação crônica e as respostas imunes melhorando a hipóxia/isquemia tecidual na neuropatia por aprisionamento nervoso (24).

Nossa análise revelou que a expressão de EGLN1 diminuiu no grupo hipóxia

em comparação ao controle, o que é consistente com a redução da atividade das prolil-hidroxilases sob baixos níveis de oxigênio (17,20). A aplicação da FBM foi capaz de restaurar os níveis de EGLN1 para valores semelhantes aos observados no grupo controle, indicando que o pré-condicionamento com FBM pode influenciar a regulação das prolil-hidroxilases, possivelmente por meio de alterações na sinalização celular que afetam a homeostase do oxigênio. Por outro lado, a expressão de EGLN3 não apresentou diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que a regulação de EGLN1 pode ser mais sensível ao pré-condicionamento com FBM em comparação a EGLN3. Até o momento, não foram encontrados dados na literatura sobre os efeitos da FBM na expressão dos genes EGLN1 E EGLN3.

A expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) foi significativamente aumentada no grupo exposto à hipóxia, refletindo a importância da produção de óxido nítrico (NO) em processos adaptativos à hipóxia, como a vasodilatação e a melhora do fornecimento de oxigênio aos tecidos. A FBM, por sua vez, foi capaz de promover um aumento ainda maior na expressão de eNOS no grupo FBM+Hipóxia, sugerindo que o pré-condicionamento com FBM pode potencializar a produção de NO, possivelmente como uma estratégia de adaptação para otimizar o fluxo sanguíneo e a oxigenação tecidual em condições de estresse e deficiência de oxigênio (10). No entanto, a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) não foi significativamente alterada pela FBM, o que pode indicar que a produção de NO via iNOS é menos sensível à modulação por FBM. Já está bem descrito que a fotobiomodulação aumenta a expressão gênica de eNOS em células HUVEC (25). Em contraste com nosso estudo, num modelo de privação de oxigênio e glicose em células HUVEC por 30 min seguido da aplicação da fotobiomodulação no comprimento de onda 808 nm, foi observado aumento das proteínas iNOS e COX-2, demonstrando mecanismos proterores da FBM para o tratamento de isquemia cerebral (26).

A expressão de IL1 beta, IL6, e TNF alfa foram significativamente aumentadas no grupo hipóxia, o que é indicativo de uma ativação inflamatória associada ao estresse de hipóxia (2,4,8). Este aumento nas citocinas inflamatórias é um reflexo das respostas de defesa do organismo à condição de hipóxia, que muitas vezes está associada a danos teciduais e a uma resposta imune. Em nosso modelo experimental, o pré-condicionamento com FBM reduziu de forma significativa a expressão dessas citocinas inflamatórias, restabelecendo os níveis de IL1 beta, IL6, e TNF alfa para valores semelhantes aos observados no grupo controle. Isso sugere que a FBM



exerce um efeito modulador na resposta inflamatória associada à hipóxia, possivelmente por meio de vias anti-inflamatórias. Essa hipótese pode ser explicada pelo aumento da expressão de IL10, uma citocina anti-inflamatória, que foi diminuída no grupo hipóxia, mas foi aumentada no grupo FBM+Hipóxia, o que sugere que o pré-condicionamento com FBM pode ter um efeito positivo na modulação da inflamação, ajudando a restaurar a expressão de IL10. Resultado semelhante ao nosso foi obtido em um estudo com linhagem de células de fibroblastos de pele humana (WS1) que foram expostas a ambiente hipóxico, e foram expostas a fotobiomodulação numa densidade de energia de 5 J/cm<sup>2</sup> usando um laser de diodo de onda contínua de 636 nm. Os resultados demonstraram que em células com hipóxia a FBM causou em uma redução na citocina inflamatória IL-6 (27).

Com o exposto acima, nossos resultados fornecem evidências importantes sobre o impacto do pré-condicionamento com fotobiomodulação na modulação da expressão gênica em células HUVEC submetidas à hipóxia. A partir da análise de expressão de RNAm de genes envolvidos em processos de inflamação e adaptação à hipóxia, observamos que o pré-condicionamento com FBM foi capaz de atenuar a resposta inflamatória induzida pela hipóxia, evidenciada pela redução significativa das citocinas pró-inflamatórias (IL1 beta, IL6 e TNF alfa) e pelo aumento nos níveis de IL10, uma citocina anti-inflamatória. Além disso, o tratamento com FBM também foi capaz de modular a expressão de genes reguladores da hipóxia, como HIF1 e EGLN1, sugerindo que o pré-condicionamento pode influenciar a resposta celular à baixa concentração de oxigênio.

Embora o efeito da fotobiomodulação tenha sido expressivo para alguns genes, como HIF1 e EGLN1, a expressão de outros genes, como EGLN3 e iNOS, não mostrou modulação significativa pelo tratamento. Isso indica que o efeito da FBM pode ser específico para certos mecanismos moleculares e destaca a complexidade da regulação gênica em condições de hipóxia.

Nossos achados reforçam o potencial terapêutico do pré-condicionamento com FBM para melhorar a resposta celular à hipóxia, principalmente em células endoteliais, com possíveis implicações em estratégias de tratamento para doenças relacionadas à insuficiência de oxigênio. Contudo, mais estudos são necessários para aprofundar o entendimento dos mecanismos subjacentes e avaliar a eficácia clínica dessa abordagem.

## **6 CONCLUSÃO**

O pré condicionamento com a fotobiomodulação em células HUVEC foi capaz de modular a expressão de genes reguladores da hipóxia, como HIF1 e EGLN1, sugerindo que o pré-condicionamento pode influenciar a resposta celular à baixa concentração de oxigênio. Ainda, o pré-condicionamento com FBM foi capaz de atenuar a resposta inflamatória induzida pela hipóxia, evidenciada pela redução significativa das citocinas pró-inflamatórias (IL1 beta, IL6 e TNF alfa) e pelo aumento nos níveis de IL10, uma citocina anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kogawa EM, Kato MT, Santos CN, Conti PCR. Evaluation of the efficacy of low-level laser therapy (LLLT) and the microelectric neurostimulation (MENS) in the treatment of myogenic temporomandibular disorders: a randomized clinical trial. **J Appl Oral Sci Rev FOB**. setembro de 2005;13(3):280–5.
2. Frare JC, Nicolau RA. Análise clínica do efeito da fotobiomodulação laser (GaAs - 904 nm) sobre a disfunção temporomandibular. **Braz J Phys Ther**. fevereiro de 2008;12:37–42.
3. Colombo F, Neto A de APV, Sousa APC de, Marchionni AMT, Pinheiro ALB, Reis SR de A. Effect of Low-Level Laser Therapy ( $\lambda$ 660 nm) on Angiogenesis in Wound Healing: A Immunohistochemical Study in a Rodent Model. **Braz Dent J**. agosto de 2013;24:308–12.
4. Ocon CA, Musse J de O, Olímpio A, Andrade EL, Capelo CN, Reis MJ dos, et al. Efeito da terapia de fotobiomodulação empregando o laser de baixa intensidade e da magnetoterapia, sobre células endoteliais humanas (HUVECS). **Braz J Health Rev**. 28 de fevereiro de 2024;7(1):7559–80.
5. 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**. janeiro de 2005;36(1):8–12.
6. Carvalho MHC, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. The role of endothelium in vascular reactivity. **Rev Bras Pesqui Méd Biol**. 1989;533–45.
7. Hamblin MR, Liebert A. Photobiomodulation **Therapy Mechanisms Beyond Cytochrome c Oxidase**. Photobiomodulation Photomed Laser Surg [Internet]. 16 de fevereiro de 2022 [citado 11 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/photob.2021.0119>
8. Góralczyk K, Szymańska J, Łukowicz M, Drela E, Kotzbach R, Dubiel M, et al. Effect of LLLT on endothelial cells culture. **Lasers Med Sci**. 1º de janeiro de 2015;30(1):273–8.
9. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, 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 Off J Pol Physiol Soc**. junho de 2013;64(3):387–91.
10. Terena SML, Mesquita-Ferrari RA, de Siqueira Araújo AM, Fernandes KPS, Fernandes MH. Photobiomodulation alters the viability of HUVECs cells. **Lasers Med Sci**. fevereiro de 2021;36(1):83–90.
11. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **Br J Pharmacol**. junho de 2017;174(12):1591–619.
12. Fátima LA de, Papa P de C. Vascular endothelial growth factor (VEGF): transcriptional and posttranscriptional regulation. **Rev Biol**. 15 de abril de 2010;4(1):22–7.
13. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med**. abril de 2000;6(4):389–95.
14. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pagès M. **Circulating biomarkers. Thromb Res**. outubro de 2012;130 Suppl 1:S12-15.
15. Karu T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomed Laser Surg**. abril de 2010;28(2):159–60.

16. Carvalho MHC de, Scivoletto R, Nigro D, Fortes ZB. Funcoes fisiologicas do endotelio vascular. **Rev Soc Cardiol Estado Sao Paulo**. 1996;6(2):121–8.
17. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. **Genes Dev**. 1º de março de 2006;20(5):557–70.
18. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**. janeiro de 1999;31(1):61–74.
19. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. **Blood**. 1º de outubro de 1998;92(7):2260–8.
20. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol**. novembro de 2006;70(5):1469–80.
21. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. **Curr Opin Genet Dev**. outubro de 1998;8(5):588–94.
22. Bahr AC, Naasani LIS, de Gregório E, Wink MR, da Rosa Araujo AS, Turck P, et al. Photobiomodulation improves cell survival and death parameters in cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation. **J Photochem Photobiol B**. 2024;112991–112991.
23. Zhang P, Zhang X, Zhu H. Photobiomodulation at 660 nm promotes collagen synthesis via downregulation of HIF-1 $\alpha$  expression without photodamage in human scleral fibroblasts in vitro in a hypoxic environment. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol**. setembro de 2023;261(9):2535–45.
24. Hsieh YL, Chou LW, Chang PL, Yang CC, Kao MJ, Hong CZ. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). **J Comp Neurol**. 1º de setembro de 2012;520(13):2903–16.
25. Chen CH, Hung HS, Hsu SH. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. **Lasers Surg Med**. janeiro de 2008;40(1):46–54.
26. Gerace E, Cialdai F, Sereni E, Lana D, Nosi D, Giovannini MG, et al. NIR Laser Photobiomodulation Induces Neuroprotection in an In Vitro Model of Cerebral Hypoxia/Ischemia. **Mol Neurobiol**. outubro de 2021;58(10):5383–95.
27. Sekhejane PR, Houreld NN, Abrahamse H. Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro. **Photomed Laser Surg**. agosto de 2011;29(8):521–30.

## ANEXO 1 - CHECKLIST

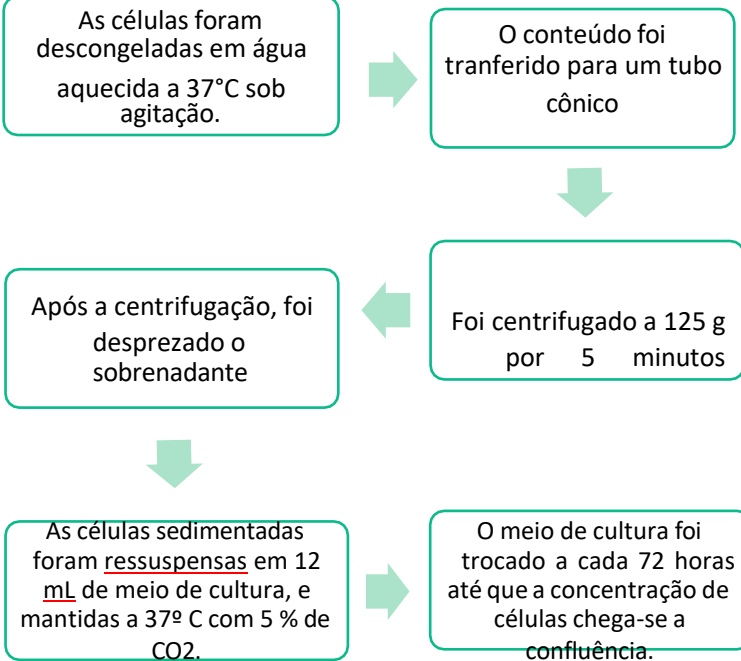
Tópico	Nº item	Recomendação	Pag. que consta esse item no seu projeto	
Desenho do estudo	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descreva os grupos experimentais, incluindo grupo controle.</li> <li>• Descreva a procedência das células: cultura primária ou linhagem celular.</li> <li>• Para cultura primária: 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>	16 e 17	<div> <div>Linhagem comercial de células Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs)</div> <div> <div>CONTROLE</div> <div>HIPÓXIA</div> <div>FBM+HIPÓXIA</div> </div> </div> <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.		<div> <div>Células HUVECs em garrafa matriz de 75 cm<sup>2</sup></div> </div>

			18	<div>CONTROLE</div> <div>Em garrafa</div> <div>De 25cm²</div> <div>Quantidade</div> <div>1x10<sup>6</sup></div> <div>células</div> <div>HIPÓXIA</div> <div>Em garrafa</div> <div>De 25cm²</div> <div>Quantidade</div> <div>1x10<sup>6</sup></div> <div>células</div> <div>FBM +</div> <div>HIPÓXIA</div> <div>Em garrafa</div> <div>De 25cm²</div> <div>Quantidade</div> <div>1x10<sup>6</sup></div> <div>células</div>
	2b	Explique como o número de células foi definido para seu experimento/análise. (sugerido incluir a escolha do número de células com base nas análises a serem realizadas).		

<p><b>Critérios de controle</b></p>	<p><b>3</b></p>	<p>Descreva os critérios de controle utilizados para o experimento, incluindo percentual de células viáveis, condição de confluência (número de células/área).</p>	<p>16</p>	<p>As células foram descongeladas em água aquecida 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 serão ressuspensas em 12 mL de meio de cultura, e 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 as concentrações de células atingissem 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 corante Azul de Tripan e feita a contagem das células.</p>
-------------------------------------	-----------------	--	-----------	---

<b>Cegamento</b>	<b>4</b>	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.		Não se aplica
<b>Desfechos</b>	<b>5</b>	Defina claramente todos os desfechos que serão avaliados (ex: morte celular, proliferação, marcadores celulares e moleculares)	14	<p>Em células endoteliais humanas (HUVEC) submetidas a hipoxia e irradiadas com a FBM avaliamos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterações na expressão de RNA mensageiro envolvidos na hipoxia (genes HIF-1, EGLN1 e EGLN3).</li> <li>- Alterações da expressão de RNA mensageiro envolvidos no processo inflamatório (genes e-NOS, iNOS, IL-1b, IL-6, IL-10 e TNF).</li> </ul>



<p><b>Procedimentos experimentais</b></p>	<p><b>6a</b></p>	<p>Condições de cultivo: temperatura, tipo de meio, suplementações (soro, fatores de crescimento, antifúngicos, antibióticos entre outros).</p>	<p>16</p>	 <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 37º 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 9mL de meio de cultura (RPMI Medium 1964, 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).</p>
---	------------------	---	-----------	---

	6b	<p>Para cada análise, relate o número de células em cada grupo experimental e número de replicatas.</p> <p>Incluir detalhadamente a condição experimental (placa, quantidade de poços/placas, frascos de cultivo) e distribuição dos grupos experimentais.</p> <p>Intervenção realizada (tratamento): quando e com que frequência.</p>	17, 18, 19 e 20	<p>Após proliferação as células foram tratadas com:</p> <pre> graph TD     A[5 mL de tripsina (0,5%) por 5 minutos] --&gt; B[O meio de cultura será trocado a cada 72 horas até que a concentração de células antiga a confluência.]     B --&gt; C[Após o desprendimento celular será acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).]     C --&gt; D[O conteúdo celular será transferido para um tubo graduado para 50 mL e centrifugado a 125 g por 5 minutos]     E[Em seguida será realizado teste de viabilidade celular utilizando o corante Azul de Tripán e feita a contagem das células.] --&gt; F[O meio de cultura será trocado a cada 72 horas até que a concentração de células antiga a confluência.]     F --&gt; G[As células serão mantidas em garrafas de 75 cm²]     G --&gt; H[Para os experimentos de hipóxia, serão soltas da garrafa e transferidas para garrafas de 25 cm².]     </pre> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 10px 0;"> <p><b>Fotobiomodulação (FBM)</b></p> <p>Comprimento de onda: 660 nm</p> <p>Potência: 10 mW</p> <p>Densidade de energia: 1,5 J/cm<sup>2</sup></p> <p>Tempo de aplicação: 6 segundos</p> <p>Área irradiada: 0,04 cm<sup>2</sup></p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">             FBM + HIPÓXIA         </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">             FBM + HIPÓXIA (Hipóxia pós aplicação de FBM)         </div> </div>
--	----	--	-----------------	--

<b>Métodos estatísticos</b>	<b>7</b>	Descreva em detalhes os métodos estatísticos utilizados em cada análise, incluindo o software utilizado.	22	<p>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 <i>One-Way</i> com <i>Post-Hoc</i> de Bonferroni. Foi estabelecido o valor de <math>p &lt; 0,05</math> para significância estatística. As análises foram 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/descritivas 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

23, 24, 25,  
26 e 27

