



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
BIOFOTÔNICA

MOHAMMADHOSSEIN SHAKER

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO, VIABILIDADE CELULAR E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS J774 EXPOSTOS AO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

São Paulo, SP

2026



MOHAMMADHOSSEIN SHAKER

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO, VIABILIDADE CELULAR E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS J774 EXPOSTOS AO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para
obtenção do título de Mestre em Medicina - Biofotônica.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Cinthya Cosme Gutierrez Duran

São Paulo, SP

2026

Shaker, Mohammadhossein.

Efeitos da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo, viabilidade celular e marcadores inflamatórios em macrófagos J774 expostos ao peróxido de hidrogênio. / Mohammadhossein Shaker. 2026.

64 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2026.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Cinthya Cosme Gutierrez Duran.

1. Estresse oxidativo. 2. Macrófagos. 3. Fotobiomodulação. 4. Inflamação. 5. Viabilidade celular.

I. Duran, Cinthya Cosme Gutierrez. II. Título

CDU 615.831



São Paulo, 29 de junho de 2026.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): MohammadHossein Shaker

Título da Dissertação: "Efeito da fotobiomodulação sobre respostas inflamatórias induzidas por estresse oxidativo em macrófagos J774A.1".

Presidente: PROF^a. DR^a. CINTHYA COSME GUTIERREZ DURAN *Cintya CG Duran*

Membro: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI *Raquel Agnelli Mesquita Ferrari*

Membro: PROF. DR. ADAGMAR ANDRIOLO *Adagmar Andriolo*

DEDICATÓRIA

À minha mãe, que sempre foi meu maior apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, à minha mãe, meu maior apoio ao longo de todos esses anos. Sua força, dedicação e insistência para que eu nunca desistisse dos estudos foram o alicerce que tornou esta conquista possível.

A Susi e ao Junior, que me acolheram quando cheguei ao Brasil e me ofereceram apoio fundamental nos momentos mais difíceis dessa nova jornada. Sem vocês, minha adaptação teria sido muito mais difícil.

À Rosani e à Alessandra, companheiras de laboratório que estiveram ao meu lado em cada etapa desta pesquisa. A dedicação, a paciência e o suporte de vocês foram indispensáveis para que este trabalho fosse concluído.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cinthya Cosme Gutierrez Duran, que me acompanha desde a graduação e que, com sabedoria e generosidade, guiou cada passo desta pesquisa. Sua confiança no meu potencial foi determinante para que eu chegasse até aqui.

Minha sincera gratidão, Prof.^a Raquel, pelo apoio, orientação e valiosas contribuições ao longo do desenvolvimento deste projeto. Sua disponibilidade, conhecimento científico e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade de crescimento acadêmico e pela estrutura oferecida ao longo da realização deste mestrado.

Por fim, agradeço ao povo brasileiro, que me recebeu de braços abertos e me fez sentir em casa. A receptividade, o calor humano e a generosidade deste povo tornaram possível não apenas este estudo, mas toda a minha trajetória neste país.

FINANCIAMENTOS

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE), POR MEIO DO PROGRAMA DE BOLSAS PARA FORMAÇÃO DO PESQUISADOR E DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), PROCESSO Nº 88887.33947/2025-00.

RESUMO

A inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na disfunção celular, no dano tecidual e na manutenção de respostas inflamatórias. Os macrófagos participam da resposta imune inata e modulam a produção de citocinas associadas à inflamação e ao equilíbrio redox. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é amplamente utilizado em modelos *vitro in* para induzir estresse oxidativo controlado, enquanto a fotobiomodulação (FBM) tem sido investigada por seus efeitos sobre a atividade mitocondrial, a viabilidade celular e mediadores inflamatórios. Este estudo avaliou os efeitos da FBM com laser de 780 nm sobre a viabilidade metabólica, a morfologia celular e a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . As células foram distribuídas em sete grupos: controle, H_2O_2 50 μM , H_2O_2 100 μM , H_2O_2 200 μM , H_2O_2 50 μM + FBM, H_2O_2 100 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM. O estresse oxidativo foi induzido pela exposição ao H_2O_2 por 1 hora. Em seguida, as células foram irradiadas com laser infravermelho de 780 nm, potência de 70 mW, energia total de 1,05 J, exposição radiante de 26,25 J/cm², modo contínuo, tempo de 15 segundos, ponto único e sessão única. Após a irradiação ou manipulação simulada, as células foram incubadas por 24 e 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, a morfologia por microscopia de luz, a proteína total por espectrofotometria em NanoDrop e os níveis de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 por ELISA, com normalização das citocinas pela proteína total do sobrenadante. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$. O H_2O_2 reduziu a viabilidade metabólica e induziu alterações morfológicas progressivas, especialmente nas maiores concentrações. Em 24 horas, a FBM aumentou significativamente a viabilidade nos grupos 50 μM + FBM e 200 μM + FBM em comparação aos respectivos grupos não irradiados; em 48 horas, não houve diferenças significativas entre os grupos H_2O_2 e H_2O_2 + FBM. A proteína total não diferiu entre os grupos. O H_2O_2 aumentou os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, enquanto a FBM reduziu significativamente essa citocina em comparação aos respectivos grupos não irradiados. Para IL-6, não houve diferenças em 24 horas; em 48 horas, os grupos H_2O_2 100 μM e 200 μM apresentaram redução em relação ao controle, enquanto os grupos tratados com FBM mantiveram níveis mais elevados em comparação aos respectivos grupos não irradiados. Conclui-se que a FBM com laser de 780 nm modulou a resposta de macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , aumento da viabilidade metabólica em condições específicas, redução de $\text{TNF}\alpha$ e manutenção de IL-6 em determinados grupos após 48 horas.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Macrófagos; Fotobiomodulação; Inflamação; Viabilidade Celular.

ABSTRACT

Inflammation and oxidative stress are involved in cellular dysfunction, tissue damage, and the persistence of inflammatory responses. Macrophages participate in innate immunity and modulate cytokine production associated with inflammation and redox balance. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is widely used in *in vitro* models to induce controlled oxidative stress, whereas photobiomodulation (PBM) has been investigated for its effects on mitochondrial activity, cell viability, and inflammatory mediators. This study evaluated the effects of 780-nm PBM on metabolic viability, cell morphology, and TNF- α and IL-6 production in J774A.1 macrophages subjected to H_2O_2 -induced oxidative stress. Cells were allocated into seven groups: control, H_2O_2 50 μM , H_2O_2 100 μM , H_2O_2 200 μM , H_2O_2 50 μM + PBM, H_2O_2 100 μM + PBM, and H_2O_2 200 μM + PBM. Oxidative stress was induced by exposure to H_2O_2 for 1 hour. Cells were then washed, centrifuged to obtain a cell pellet, and, in the designated groups, irradiated with a 780-nm infrared laser, 70 mW output power, 1.05 J total energy, 26.25 J/cm² radiant exposure, continuous mode, 15 seconds, one irradiation point, and a single session. Non-irradiated groups underwent the same manipulation with the device turned off. After irradiation or sham manipulation, cells were resuspended in fresh culture medium and incubated for 24 or 48 hours. Cell viability was assessed by MTT assay, morphology by light microscopy, total protein by NanoDrop spectrophotometry, and TNF- α and IL-6 levels by ELISA, with cytokine concentrations normalized to total protein in the supernatant. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with $p < 0.05$ considered significant. H_2O_2 reduced metabolic viability and induced progressive morphological alterations, especially at higher concentrations. At 24 hours, PBM significantly increased viability in the 50 μM + PBM and 200 μM + PBM groups compared with their respective non-irradiated groups; at 48 hours, no significant differences were observed between H_2O_2 and H_2O_2 + PBM groups. Total protein did not differ among groups. H_2O_2 increased TNF- α levels, whereas PBM significantly reduced this cytokine compared with the respective non-irradiated groups. For IL-6, no differences were observed at 24 hours; at 48 hours, the H_2O_2 100 μM and 200 μM groups showed reduced levels compared with the control group, whereas PBM-treated groups maintained higher IL-6 levels than their respective non-irradiated groups. In conclusion, PBM with a 780-nm laser modulated the response of J774A.1 macrophages subjected to H_2O_2 -induced oxidative stress, with better qualitative preservation of cell morphology, increased metabolic viability under specific conditions, reduced TNF- α levels, and maintenance of IL-6 levels in selected groups after 48 hours.

Keywords: Oxidative stress; Macrophages; Photobiomodulation; Inflammation; Cell viability.

DESTAQUES

- O estudo investiga a interação entre fotobiomodulação e peróxido de hidrogênio em macrófagos J774, tema pouco explorado na literatura em modelos de estresse oxidativo.
- Foram utilizadas diferentes concentrações de H_2O_2 (50, 100 e 200 μM), permitindo analisar respostas celulares frente a distintos graus de estresse oxidativo.
- A fotobiomodulação com laser de 780 nm foi associada à melhor preservação morfológica qualitativa dos macrófagos expostos ao estresse oxidativo.
- Emprega protocolo padronizado de FBM com parâmetros precisos (780 nm, 70 mW, 26,25 J/cm^2), garantindo reprodutibilidade experimental.
- Os achados contribuem para a compreensão dos efeitos celulares da fotobiomodulação em modelo experimental *in vitro* de estresse oxidativo.

HIGHLIGHTS

- This study evaluated the effects of photobiomodulation in J774A.1 macrophages subjected to an *in vitro* model of hydrogen peroxide-induced oxidative stress.
- Different H₂O₂ concentrations (50, 100, and 200 µM) were used to analyze cellular responses to distinct degrees of oxidative stress.
- Photobiomodulation with a 780-nm laser was associated with better qualitative preservation of macrophage morphology after oxidative stress.
- Photobiomodulation increased metabolic viability under specific 24-hour conditions and reduced TNF-α levels compared with the respective nonirradiated groups.
- These findings contribute to the understanding of the cellular effects of photobiomodulation in an *in vitro* model of oxidative stress.

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE RELACIONADOS AO ESTUDO

(<https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-developmentgoals/>)

1. Erradicação da Pobreza / No poverty ()
2. Fome zero e agricultura sustentável / Zero hunger ()
3. Saúde e bem-estar / Good health and well-being (X)
4. Educação de Qualidade / Quality education (X)
5. Igualdade de Gênero / Gender equality ()
6. Água potável e saneamento / Clean water and sanitation ()
7. Energia limpa e acessível / Affordable and clean energy ()
8. Trabalho decente e crescimento econômico/Decent work and economic growth ()
9. Indústria, inovação e infraestrutura/Industries, innovation and infrastructure, ()
10. Redução das desigualdades / Reduced inequalities ()
11. Cidades e comunidades sustentáveis / Sustainable cities and communities ()
12. Consumo e produção responsáveis/Responsible consumption and production ()
13. Ação contra a mudança global do clima / Climate action ()
14. Vida na água / Life below water ()
15. Vida terrestre / Life on land ()
16. Paz, justiça e instituições eficazes / Peace, justice and strong institutions ()
17. Parcerias e meios de implementação / Partnerships for the goals ()

RESUMO PARA LEIGOS

A inflamação é uma reação natural do corpo para combater infecções e ajudar na cicatrização. No entanto, quando ela dura muito tempo ou acontece de forma exagerada, pode prejudicar as células e contribuir para o surgimento de doenças. Neste estudo, foram analisadas células de defesa do organismo, chamadas macrófagos. Em laboratório, essas células foram expostas ao peróxido de hidrogênio, uma substância usada para provocar um estresse nas células e simular situações de inflamação. Depois, parte delas recebeu um tratamento com laser de baixa intensidade (780 nm), conhecido como fotobiomodulação. O objetivo foi verificar se esse laser poderia proteger as células e reduzir os efeitos causados pelo estresse. Para isso, os pesquisadores avaliaram se as células continuavam vivas, como elas se apresentavam ao microscópio e a quantidade de substâncias relacionadas à inflamação. Os resultados mostraram que o peróxido de hidrogênio prejudicou as células, principalmente nas maiores concentrações. Já o tratamento com laser ajudou a preservar melhor as células, aumentou sua sobrevivência em algumas situações e reduziu a produção de uma substância ligada à inflamação, chamada TNF- α . Em alguns casos, também ajudou a manter a produção de outra substância, a IL-6, indicando que as células continuavam funcionando melhor. Como esta pesquisa foi realizada apenas em células cultivadas em laboratório, os resultados ainda não podem ser aplicados diretamente em pacientes. Mesmo assim, eles mostram que a fotobiomodulação tem potencial para ajudar no controle da inflamação e podem servir de base para futuras pesquisas e novos tratamentos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fluxograma do delineamento experimental	38
Figura 2.	Morfologia celular dos macrófagos J774A.1 nos grupos experimentais	45
Figura 3.	Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 avaliada pelo ensaio de MTT	47
Figura 4.	Níveis de IL-6 nos grupos experimentais após 24 e 48 horas	48
Figura 5.	Níveis de TNF- α nos grupos experimentais após 24 e 48 horas...	49
Figura 6.	Níveis de TNF- α em macrófagos J774A.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM 41
-----------	--

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CCO	Citocromo C Oxidase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBM	Fotobiomodulação
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LPS	Lipopolissacarídeo
mW	Miliwatts
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
nm	Nanometros
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate-buffered saline
ROS	Reactive Oxygen Species
SFB	Soro fetal bovino
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.1.	Processo Inflamatório	18
1.2.	Macrófagos e citocinas inflamatórias	20
1.3.	Estresse Oxidativo e uso do peróxido de hidrogênio em modelos experimentais	23
1.4.	Fotobiomodulação	26
1.5.	Fotobiomodulação em macrófagos.....	29
1.6.	Importância dos estudos experimentais in vitro em Biofotônica	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1.	Objetivo Geral	36
3.2.	Específicos.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1.	Delineamento experimental.....	37
4.2.	Cultura celular	38
4.3.	Grupos experimentais	39
4.4.	Tratamento das células com H ₂ O ₂	40
4.5.	Tratamento das células utilizando a FBM	40
4.6.	Morfologia celular	41
4.7.	Viabilidade celular – MTT	42
4.8.	Normalização das amostras	42
4.9.	Quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α por ELISA.....	43
4.10.	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1.	Morfologia celular	44
5.2.	Viabilidade Celular – MTT.....	46
5.3.	Quantificação de Proteína Total.....	47
5.4.	Níveis de IL-6.....	48
5.5.	Níveis de TNF- α	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO.....	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Processo Inflamatório

A inflamação é uma resposta biológica fundamental para a manutenção da homeostase diante de agressões físicas, químicas, infecciosas ou metabólicas. Em condições fisiológicas, trata-se de um processo coordenado, dinâmico e autolimitado, cujo objetivo é reconhecer o agente agressor, recrutar células de defesa, remover estruturas danificadas e iniciar mecanismos de reparo tecidual. Essa resposta envolve alterações vasculares, ativação de células imunes, liberação de mediadores solúveis e reorganização do microambiente celular. Quando adequadamente regulada, a inflamação contribui para a defesa do organismo e para a restauração da integridade tecidual (1,3-5).

Entretanto, quando a resposta inflamatória se torna exacerbada, persistente ou mal regulada, deixa de exercer apenas uma função protetora e passa a contribuir para disfunção celular, lesão tecidual e progressão de doenças crônicas. A inflamação crônica tem sido reconhecida como um componente central na etiologia e na evolução de diferentes condições patológicas ao longo da vida, incluindo doenças cardiovasculares, metabólicas, neurodegenerativas, autoimunes e neoplásicas (1,2). Esse processo está frequentemente associado à ativação sustentada de vias imunológicas, produção contínua de citocinas, alterações metabólicas e aumento de mediadores oxidativos, estabelecendo um ciclo de dano e perpetuação inflamatória (1,3,5).

Do ponto de vista epidemiológico, doenças inflamatórias crônicas e imunomediadas representam importante carga global de morbidade, incapacidade funcional e impacto socioeconômico. A distribuição dessas doenças varia entre diferentes regiões e populações, refletindo não apenas aspectos biológicos, mas também desigualdades relacionadas ao acesso ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento adequado (2). Dessa forma, compreender os mecanismos celulares envolvidos na amplificação, manutenção e resolução da inflamação é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais precisas, seguras e direcionadas (1,4,5).

A resposta inflamatória envolve a atuação integrada de diferentes células do sistema imune, entre as quais se destacam neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, mastócitos e macrófagos. Essas células interagem entre si e com o tecido lesionado por meio da liberação de citocinas, quimiocinas, espécies reativas, fatores de crescimento e outros mediadores bioativos (3-5). A intensidade e a duração dessa resposta dependem do tipo de estímulo, da extensão da injúria, do tecido envolvido e da capacidade do organismo de ativar mecanismos regulatórios e resolutivos (4,5).

Nesse contexto, os macrófagos ocupam posição central por sua elevada plasticidade funcional e por sua capacidade de atuar em diferentes etapas da resposta inflamatória. Essas células participam da fagocitose de microrganismos e debrís celulares, da apresentação de antígenos, da liberação de citocinas e da regulação do reparo tecidual (3-6). Além disso, os macrófagos exercem papel importante na transição entre a fase inflamatória inicial e a fase de resolução, contribuindo tanto para a amplificação da resposta imune quanto para a restauração da homeostase, dependendo dos estímulos presentes no microambiente (4,5).

A ativação dos macrófagos é um processo altamente dinâmico e dependente do contexto biológico. Embora a classificação em perfis M1 e M2 seja frequentemente utilizada para fins didáticos, essa divisão representa apenas uma simplificação de um espectro funcional muito mais amplo (4,5). Na prática, os macrófagos podem apresentar características intermediárias e adaptar sua resposta conforme os sinais recebidos, como citocinas, padrões moleculares associados a patógenos, produtos de dano celular, alterações metabólicas e variações no estado redox do tecido (3-6). Portanto, a avaliação da atividade macrofágica deve considerar não apenas marcadores fenotípicos, mas também parâmetros funcionais, como viabilidade, metabolismo, morfologia e produção de mediadores inflamatórios (4-6).

Entre os principais mediadores produzidos pelos macrófagos estão o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), citocinas amplamente envolvidas na regulação da resposta inflamatória (7,9). O TNF- α está associado à ativação inflamatória, ao recrutamento de células imunes, à indução de moléculas de adesão e à amplificação de vias pró-inflamatórias. Quando produzido de forma persistente ou em excesso, pode contribuir para dano celular e manutenção da inflamação (7,9). A IL-6, por sua vez, apresenta comportamento pleiotrópico, podendo atuar em respostas pró-inflamatórias, regulatórias ou reparativas, a depender do tipo celular, do microambiente e do momento da resposta inflamatória (9).

Além da produção de citocinas, os macrófagos apresentam íntima relação com o metabolismo oxidativo. Durante a resposta inflamatória, essas células podem produzir espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, que participam da defesa contra agentes agressores, mas que também podem contribuir para lesão celular quando gerados em excesso (8,11,12). Assim, inflamação e estresse oxidativo são processos interligados, capazes de se retroalimentar e intensificar a disfunção celular. Esse eixo inflamação-estresse oxidativo é particularmente relevante em modelos experimentais que buscam compreender como diferentes intervenções podem modular a atividade de células imunes em condições de agressão controlada (1,3,11,12).

Dessa forma, o estudo da resposta inflamatória em macrófagos permite compreender mecanismos celulares importantes envolvidos na produção de citocinas, na adaptação ao estresse e na manutenção da homeostase tecidual (36). A utilização de modelos experimentais controlados, especialmente em condições de estresse oxidativo induzido, possibilita avaliar de maneira mais específica como essas células respondem a estímulos lesivos e como intervenções moduladoras, como a fotobiomodulação, podem interferir em parâmetros metabólicos, morfológicos e inflamatórios (11-13,18,19).

1.2. Macrófagos e citocinas inflamatórias

Os macrófagos são células essenciais da imunidade inata e desempenham papel estratégico na iniciação, amplificação, regulação e resolução da resposta inflamatória. Derivados de monócitos circulantes ou de populações residentes teciduais, esses fagócitos apresentam ampla capacidade de adaptação ao microambiente, respondendo a sinais provenientes de agentes infecciosos, produtos de dano celular, citocinas, alterações metabólicas e modificações no estado redox dos tecidos (3-6). Sua atuação envolve a fagocitose de microrganismos e debris celulares, apresentação de antígenos, secreção de mediadores inflamatórios e participação ativa nos processos de remodelamento e reparo tecidual (3-5).

A função dos macrófagos não é fixa, mas altamente plástica e dependente dos estímulos presentes no microambiente. Em diferentes fases da resposta inflamatória, essas células podem assumir perfis funcionais distintos, contribuindo tanto para a defesa e amplificação da inflamação quanto para a resolução do processo inflamatório e restauração da homeostase (4,5). Essa plasticidade permite que os macrófagos atuem como células integradoras entre o sistema imune, o metabolismo celular e os mecanismos de reparo,

sendo fundamentais para o equilíbrio entre eliminação do agente agressor e limitação do dano tecidual (4-6).

A classificação dos macrófagos em perfis M1 e M2 é frequentemente utilizada na literatura para representar, de forma simplificada, estados funcionais associados à resposta pró-inflamatória e à resolução/reparo, respectivamente. Entretanto, esse modelo não contempla toda a complexidade da ativação macrofágica, uma vez que os macrófagos podem apresentar fenótipos intermediários, transitórios e dependentes do contexto biológico (4,5). Assim, embora a nomenclatura M1/M2 seja útil para fins didáticos e comparativos, a interpretação da resposta dos macrófagos deve considerar a diversidade de estímulos, o tempo de exposição, o tipo celular, o tecido envolvido e os desfechos funcionais avaliados (3-6).

Em estudos experimentais, a análise de macrófagos permite compreender mecanismos celulares envolvidos na inflamação e no reparo. Linhagens celulares murinas, como a J774A.1, são amplamente utilizadas por apresentarem características compatíveis com células macrofágicas, boa reprodutibilidade experimental e resposta mensurável a estímulos inflamatórios e oxidativos (3234). Esses modelos possibilitam a investigação de parâmetros como viabilidade metabólica, morfologia, produção de citocinas, atividade mitocondrial e resposta ao estresse, contribuindo para a compreensão de mecanismos celulares em condições controladas (7,18,19,32-34).

Entre os mediadores secretados pelos macrófagos, as citocinas exercem papel central na comunicação entre células imunes e não imunes. Essas moléculas regulam o recrutamento celular, a ativação de vias inflamatórias, a diferenciação de células imunes, a resposta sistêmica à inflamação e os mecanismos de resolução e reparo (7,9). Entre as citocinas mais estudadas em modelos inflamatórios destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), ambos relacionados à modulação da resposta inflamatória e frequentemente utilizados como marcadores funcionais da atividade macrofágica (7,9,18,20).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por diferentes tipos celulares, especialmente por macrófagos ativados. Está envolvido na amplificação da resposta inflamatória, indução de moléculas de adesão, recrutamento de células imunes, ativação de vias intracelulares e regulação de outros mediadores inflamatórios (7,9). Em condições agudas, sua produção contribui para a defesa do organismo; entretanto, níveis elevados ou persistentes de TNF- α podem favorecer lesão tecidual, disfunção celular e manutenção de processos inflamatórios crônicos (1,7,9). Por esse motivo, a avaliação de TNF- α é frequentemente utilizada para investigar a intensidade da resposta inflamatória em modelos celulares e teciduais (18,20,22).

A IL-6 também é produzida por macrófagos e outras células envolvidas na resposta inflamatória. Sua atuação é pleiotrópica, podendo participar da fase aguda da inflamação, da diferenciação de células imunes, da regulação metabólica e de processos reparativos, dependendo do contexto biológico (9). Diferentemente de citocinas predominantemente pró-inflamatórias, a IL-6 pode apresentar efeitos distintos conforme o tipo celular, o microambiente, a intensidade do estímulo e o momento da análise. Assim, a interpretação dos níveis de IL-6 em modelos experimentais requer cautela, pois sua redução ou elevação pode refletir diferentes estados funcionais das células avaliadas (9).

Além das citocinas, os macrófagos participam da produção de mediadores oxidativos, incluindo espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. A produção de óxido nítrico por macrófagos ativados está relacionada à expressão da óxido nítrico sintase induzível e constitui um dos mecanismos envolvidos na defesa imunológica e na modulação inflamatória (8). Entretanto, a produção excessiva de mediadores oxidativos pode contribuir para desequilíbrio redox, dano celular e alteração da função mitocondrial, estabelecendo uma relação direta entre inflamação e estresse oxidativo (8,11,12).

Essa interação entre citocinas inflamatórias e mediadores oxidativos é especialmente relevante em modelos experimentais de lesão celular. O aumento de espécies reativas pode modificar vias de sinalização intracelular, alterar a produção de citocinas e comprometer a viabilidade metabólica das células (11,12). Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias podem intensificar a produção de mediadores oxidativos, contribuindo para um ciclo de amplificação da resposta inflamatória (1,3,8,11,12). Dessa forma, a análise conjunta de viabilidade celular, morfologia e citocinas permite compreender de maneira mais integrada a resposta dos macrófagos frente a estímulos lesivos.

No contexto da Biofotônica, os macrófagos constituem um alvo experimental relevante porque apresentam sensibilidade a estímulos luminosos e participam diretamente da regulação inflamatória. Estudos anteriores demonstraram que a fotobiomodulação pode modular a atividade mitocondrial de macrófagos, interferir na produção de mediadores inflamatórios e alterar respostas associadas à ativação celular (18,19). Assim, compreender como essas células respondem à fotobiomodulação em condições de estresse oxidativo é importante para investigar possíveis mecanismos celulares envolvidos nos efeitos antiinflamatórios e moduladores da luz.

1.3. Estresse Oxidativo e uso do peróxido de hidrogênio em modelos experimentais

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares em neutralizá-las. Em condições fisiológicas, essas espécies participam de processos importantes, como sinalização intracelular, regulação metabólica e resposta de defesa. Entretanto, quando produzidas em excesso ou quando os mecanismos antioxidantes são insuficientes, podem causar danos a lipídios, proteínas, ácido desoxirribonucleico e organelas celulares, comprometendo a viabilidade e a função celular (11,12).

A relação entre inflamação e estresse oxidativo é estreita, pois células envolvidas na resposta inflamatória, como os macrófagos, podem produzir espécies reativas de oxigênio e mediadores nitrogenados como parte dos mecanismos de defesa do organismo (8,11,12). Xie et al. (1992) demonstraram a relevância da óxido nítrico sintase induzível em macrófagos, reforçando o papel dessas células na produção de mediadores relacionados à resposta inflamatória e oxidativa (8). No entanto, a produção excessiva desses mediadores pode contribuir para disfunção celular, dano tecidual e perpetuação da inflamação, especialmente em condições nas quais a resposta inflamatória se torna persistente (1,3,5,8).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio amplamente utilizada em estudos experimentais *in vitro* para indução controlada de estresse oxidativo. Sua utilização se justifica por apresentar relativa estabilidade em comparação a outras espécies reativas e por atravessar membranas biológicas, permitindo sua ação como sinalizador redox ou como agente indutor de dano celular, dependendo da concentração e do tempo de exposição (11,12). Dessa forma, o H_2O_2 permite simular, em condições laboratoriais controladas, alterações celulares relacionadas ao desequilíbrio oxidativo.

Em modelos celulares com macrófagos, a exposição ao H_2O_2 pode interferir em diferentes parâmetros biológicos, incluindo morfologia, metabolismo, viabilidade e produção de mediadores inflamatórios (11,12). Pomari et al. (2014) demonstraram que o H_2O_2 pode modificar a expressão de genes inflamatórios em macrófagos, indicando que o estresse oxidativo é capaz de interferir diretamente em vias associadas à resposta inflamatória (11). De forma complementar, Begum et al. (2020), utilizaram H_2O_2 em células RAW 264.7 para investigar mecanismos de proteção contra estresse oxidativo, demonstrando envolvimento da via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 e da sinalização por proteína quinase ativada por mitógeno, o que reforça a utilidade desse modelo para estudar respostas celulares ao dano oxidativo (12).

A intensidade da resposta celular ao H_2O_2 depende de fatores como concentração do agente oxidante, tempo de exposição, tipo celular, densidade celular e condições do meio de cultura (11,12). Concentrações menores podem induzir respostas adaptativas ou alterações funcionais discretas, enquanto concentrações mais elevadas tendem a provocar maior comprometimento metabólico, alterações morfológicas, perda de adesão celular e redução da viabilidade (11,12). Por esse motivo, o uso de diferentes concentrações de H_2O_2 permite estabelecer gradientes de estresse oxidativo e avaliar a resposta celular frente a diferentes intensidades de injúria.

A avaliação da viabilidade celular é um dos desfechos empregados em modelos de estresse oxidativo. O ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT) é utilizado para estimar a atividade metabólica de células viáveis, baseando-se na capacidade celular de reduzir sais de tetrazólio em produtos colorimétricos mensuráveis, é importante ressaltar que a redução do MTT a cristais de formazan não decorre exclusivamente da atividade de desidrogenases mitocondriais, podendo também envolver enzimas oxidorreduzases dependentes de NAD(P)H presentes em outras organelas e no citoplasma. Dessa forma, o ensaio infere a viabilidade celular de maneira indireta, refletindo a capacidade redutora global da célula, e não exclusivamente sua atividade mitocondrial (7).

Assim, em modelos de estresse oxidativo, a redução do sinal obtido pelo MTT pode indicar comprometimento da atividade metabólica celular, especialmente relacionada à função mitocondrial, ainda que não represente diretamente uma medida isolada de proliferação celular (7,11,12).

Além da viabilidade metabólica, a avaliação morfológica fornece informações complementares sobre o estado funcional das células submetidas ao estresse oxidativo. Alterações como retração celular, arredondamento, perda de prolongamentos, redução da aderência e presença de debris podem indicar sofrimento celular e comprometimento funcional. Em macrófagos, essas alterações são relevantes, pois a morfologia está relacionada à adesão, fagocitose, ativação e capacidade de resposta ao microambiente (3-5,32-34). Dessa forma, a associação entre MTT e análise morfológica permite uma interpretação mais abrangente dos efeitos do H_2O_2 sobre os macrófagos.

O estresse oxidativo também pode interferir na produção de citocinas por macrófagos. Essas células integram sinais inflamatórios e oxidativos, podendo modificar a liberação de mediadores como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e a interleucina 6 (IL-6) em resposta a diferentes estímulos (7-9,11,12). O $TNF\alpha$ é considerado uma citocina associada à amplificação da resposta inflamatória, enquanto a IL-6 apresenta

comportamento pleiotrópico e pode estar relacionada tanto a respostas inflamatórias quanto regulatórias, dependendo do contexto celular e do momento da análise (7,9). Assim, a dosagem dessas citocinas contribui para compreender o estado funcional dos macrófagos diante da injúria oxidativa. A linhagem J774A.1 constitui um modelo experimental utilizado para estudos envolvendo macrófagos. Ralph e Nakanishi (1975), descreveram características fagocíticas e citolíticas de uma linhagem tumoral macrofágica murina, contribuindo para o estabelecimento de modelos celulares voltados à investigação da função macrofágica (33). Além disso, protocolos de isolamento e caracterização de macrófagos murinos reforçam a importância desses modelos para estudos de imunologia celular e resposta inflamatória (32). Por se tratar de uma linhagem estabelecida, a J774A.1 permite maior controle experimental, reprodutibilidade e padronização das condições de cultivo, sendo útil em estudos exploratórios e mecanísticos. Essa linhagem pode ser ativada por diferentes estímulos já bem estabelecidos na literatura. O lipopolissacarídeo (LPS) constitui o estímulo clássico, atuando via receptor toll-like 4 (TLR4) e desencadeando a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β e óxido nítrico, além da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), caracterizando o perfil pró-inflamatório M1 (32-34). A associação de LPS com interferon-gama (IFN- γ) potencializa essa resposta, amplificando a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a produção de mediadores pró-inflamatórios, sendo frequentemente utilizada quando se deseja um estímulo inflamatório mais intenso (8,32-34). O forbol-miristato-acetato (PMA) constitui outra forma de ativação amplamente empregada, atuando diretamente sobre a proteína quinase C (PKC) de maneira independente de receptores de superfície, sendo utilizado tanto para induzir ativação celular quanto como controle positivo em ensaios de produção de espécies reativas de oxigênio (32-34). Em contraposição a esse perfil pró-inflamatório, estímulos como IL-4 e IL-13 podem induzir um perfil funcional alternativo (M2), associado a maior expressão de arginase-1 e de mediadores regulatórios (4,5,32,35).

No presente estudo, o uso do H₂O₂ como agente indutor de estresse oxidativo permite avaliar a resposta de macrófagos J774A.1 a um estímulo oxidativo isolado, sem associação direta a componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo. Essa escolha metodológica possibilita investigar de forma mais específica como o desequilíbrio redox interfere na viabilidade metabólica, na morfologia celular e na produção de citocinas. Além disso, a utilização de diferentes concentrações de H₂O₂ permite analisar se a resposta celular e a possível modulação pela fotobiomodulação variam conforme a intensidade da agressão oxidativa (11,12,18,19).

1.4. Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) é uma modalidade baseada na aplicação de luz não ionizante, geralmente por meio de lasers de baixa potência ou diodos emissores de luz, com o objetivo de modular processos celulares e teciduais sem provocar efeito térmico ablativo. A terminologia FBM passou a ser recomendada para substituir expressões como terapia com laser de baixa intensidade, por representar de forma mais adequada os efeitos biológicos produzidos pela luz em células e tecidos (27). Essa abordagem tem sido investigada em diferentes condições experimentais e clínicas, especialmente por seus efeitos sobre inflamação, dor, reparo tecidual, função mitocondrial e resposta celular ao estresse (13,15,23,28).

Os efeitos biológicos da FBM dependem da interação entre fótons e estruturas celulares capazes de absorver luz, denominadas cromóforos. Entre os principais cromóforos descritos na literatura, destacam-se componentes da cadeia respiratória mitocondrial, especialmente a citocromo c oxidase, que apresenta bandas de absorção nos espectros vermelho e infravermelho próximo (15,16,26). Karu (1999), descreveu mecanismos primários e secundários da ação da luz visível e do infravermelho próximo sobre células, destacando que a absorção inicial da luz pode desencadear alterações bioquímicas e sinalizações celulares subsequentes (16). De forma complementar, Karu e Kolyakov (2005), demonstraram espectros de ação relacionados a respostas celulares relevantes para a fototerapia, reforçando a importância do comprimento de onda na determinação dos efeitos biológicos (26).

A mitocôndria é considerada um dos principais alvos celulares da FBM, pois participa da produção de energia, da regulação do estado redox e da sinalização relacionada à sobrevivência celular. De Freitas e Hamblin (2016), propuseram que a absorção da luz por cromóforos mitocondriais pode alterar o transporte de elétrons, o potencial de membrana mitocondrial, a produção de adenosina trifosfato e a liberação controlada de espécies reativas de oxigênio, desencadeando respostas celulares secundárias (15). Ferraresi et al. (2015), demonstraram que a terapia com luz de baixa intensidade pode aumentar o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de adenosina trifosfato em miotubos C2C12, fornecendo suporte experimental para o envolvimento da função mitocondrial nos efeitos da FBM (17).

Embora as espécies reativas de oxigênio sejam frequentemente associadas a dano celular quando produzidas em excesso, em concentrações controladas elas também atuam como moléculas sinalizadoras e importantes para homeostase. Nesse sentido, a FBM pode

modular a sinalização redox celular, promovendo respostas adaptativas relacionadas ao metabolismo, à sobrevivência celular e à regulação inflamatória (15,21). Chen et al. (2011), demonstraram que a terapia com laser de baixa intensidade pode ativar o fator nuclear kappa B por meio da geração de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos embrionários murinos, evidenciando que a produção controlada dessas espécies pode participar da sinalização desencadeada pela luz (21). Assim, os efeitos da FBM não devem ser interpretados apenas como antioxidantes diretos, mas como resultado de uma modulação complexa de vias bioenergéticas, redox e inflamatórias (13,15,21).

No contexto inflamatório, a FBM tem sido associada à modulação de mediadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imune. Hamblin (2017), descreveu mecanismos e aplicações dos efeitos anti-inflamatórios da FBM, destacando sua capacidade de influenciar células inflamatórias, citocinas, edema, mediadores oxidativos e vias de resolução da inflamação (13). Em modelo experimental de inflamação aguda, Aimbire et al. (2006), observaram redução dose-dependente dos níveis de fator de necrose tumoral alfa após aplicação de laser de baixa potência, indicando que a luz pode modular citocinas próinflamatórias em condições específicas (20). Oliveira et al. (2014), também demonstraram que a terapia com laser de baixa intensidade reduziu inflamação pulmonar aguda em modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo induzida por lipopolissacarídeo, reforçando o potencial modulador da luz em modelos inflamatórios (22).

Apesar dos efeitos promissores descritos na literatura, a resposta à FBM é fortemente dependente dos parâmetros dosimétricos empregados. Comprimento de onda, potência, energia, irradiância, exposição radiante, área irradiada, tempo de aplicação, modo de emissão e número de sessões podem modificar a resposta biológica obtida (15,23,28). Chung et al. (2012), destacaram que a compreensão dos “elementos essenciais” da terapia com luz de baixa intensidade é fundamental para interpretar os resultados e comparar protocolos, uma vez que pequenas variações na dosimetria podem resultar em efeitos distintos (28). Farivar et al. (2014), também ressaltaram que os efeitos biológicos da FBM dependem da dose e das condições experimentais, reforçando a necessidade de descrição metodológica detalhada (23).

A relação dose-resposta da FBM é frequentemente descrita como bifásica, ou seja, doses muito baixas podem não produzir efeito mensurável, enquanto doses excessivas podem reduzir ou anular os efeitos biológicos esperados. Essa característica torna essencial a definição adequada dos parâmetros de irradiação e a interpretação cautelosa dos resultados obtidos (15,23,28). Em estudos *in vitro*, essa questão é ainda mais relevante, pois fatores como distância entre a fonte de luz e as células, área efetivamente irradiada, volume de

meio, densidade celular e geometria do recipiente podem interferir na energia entregue ao sistema biológico (15,28).

O comprimento de onda utilizado também exerce papel central na resposta celular. Comprimentos de onda na faixa do vermelho e do infravermelho próximo têm sido amplamente empregados em estudos de FBM por sua interação com cromóforos mitocondriais e por seus efeitos descritos sobre metabolismo celular, inflamação e reparo (15,16,26,28). O laser de 780 nm, situado no espectro do infravermelho próximo, tem sido utilizado em diferentes modelos experimentais e apresenta relevância para estudos que investigam atividade mitocondrial, viabilidade celular e modulação inflamatória (18,19,29). Fernandes et al. (2015), demonstraram que a irradiação com lasers de 660 nm e 780 nm modulou marcadores inflamatórios em células semelhantes a macrófagos J774 ativadas, enquanto Souza et al. (2014), observaram efeito da FBM sobre a atividade mitocondrial de macrófagos (18,19).

Dessa forma, a FBM representa uma intervenção de interesse no campo da Biofotônica por sua capacidade de modular funções celulares relacionadas à bioenergética, sinalização redox e inflamação. No entanto, seus efeitos dependem de múltiplas variáveis, incluindo tipo celular, condição metabólica inicial, presença de estresse, comprimento de onda e dose utilizada (13,15,23,28). Por esse motivo, estudos experimentais controlados são necessários para compreender como protocolos específicos de FBM interferem em parâmetros celulares, especialmente em modelos nos quais inflamação e estresse oxidativo estão interligados.

1.5. Fotobiomodulação em macrófagos

Os macrófagos constituem um modelo celular relevante para estudos envolvendo FBM, pois participam diretamente da resposta inflamatória, da produção de citocinas, da fagocitose, da modulação do microambiente tecidual e da transição entre inflamação e reparo (3-6). Essas células apresentam elevada plasticidade funcional e respondem a diferentes estímulos, incluindo mediadores inflamatórios, alterações metabólicas e variações no estado redox celular (4,5). Por esse motivo, investigar os efeitos da FBM em macrófagos pode contribuir para a compreensão dos mecanismos celulares associados à modulação inflamatória pela luz (13,18,19).

A literatura demonstra que a FBM pode interferir em parâmetros funcionais de macrófagos, especialmente aqueles relacionados à atividade mitocondrial e à produção de mediadores inflamatórios (18,19). Esse achado é coerente com os mecanismos propostos para a FBM, nos quais a absorção de fótons por cromóforos mitocondriais pode modificar o transporte de elétrons, a produção de adenosina trifosfato, o potencial de membrana mitocondrial e a sinalização redox (15-17).

Em macrófagos, a modulação da atividade mitocondrial apresenta especial importância, pois a mitocôndria participa não apenas da produção energética, mas também da regulação de espécies reativas de oxigênio, da adaptação ao estresse e da ativação de vias inflamatórias (15,17,21). Chen et al. (2011), demonstraram que a FBM pode ativar o fator nuclear kappa B por meio da geração de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos embrionários murinos, indicando que a sinalização redox desencadeada pela luz pode influenciar vias celulares relacionadas à inflamação (21). Embora esse estudo tenha sido realizado em outro tipo celular, seus achados ajudam a sustentar a hipótese de que a FBM pode atuar por mecanismos redox e bioenergéticos também relevantes para macrófagos (15,19,21).

Estudos específicos com células semelhantes a macrófagos J774 demonstram que a FBM pode modular marcadores associados à ativação inflamatória (18,19). Fernandes et al. (2015), avaliaram os efeitos dos lasers de 660 nm e 780 nm em células J774 ativadas e observaram modulação de marcadores inflamatórios relacionados ao perfil pró-inflamatório, indicando que esses comprimentos de onda podem interferir na resposta funcional de macrófagos em condições de ativação (18). Esse estudo é particularmente relevante para a presente dissertação por utilizar uma linhagem celular semelhante e por incluir o comprimento de onda de 780 nm, que também foi empregado neste trabalho.

A ação da FBM sobre macrófagos também pode estar relacionada à regulação de citocinas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina associada à amplificação da resposta inflamatória, sendo frequentemente utilizada como marcador de ativação inflamatória em modelos celulares e teciduais (7,9,20). A interleucina 6 (IL-6), por sua vez, apresenta comportamento pleiotrópico e pode participar de respostas pró-inflamatórias, regulatórias ou reparativas, dependendo do tipo celular, do microambiente e do momento da análise (9). Assim, a avaliação de TNF- α e IL-6 em estudos com macrófagos submetidos à FBM permite investigar se a luz interfere na produção de mediadores relevantes para a resposta inflamatória (9,18,20,22).

A relação entre FBM, macrófagos e estresse oxidativo é particularmente importante porque a resposta inflamatória está intimamente associada ao equilíbrio redox celular (8,11,12,15,21). Macrófagos podem produzir espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico durante a resposta inflamatória, e essas moléculas podem atuar tanto na defesa celular quanto na amplificação do dano quando produzidas em excesso (8,11,12). Como a FBM pode modular a função mitocondrial e a sinalização redox, torna-se relevante investigar seus efeitos em macrófagos submetidos a condições de estresse oxidativo controlado (15,19,21).

Grande parte dos estudos experimentais envolvendo FBM e macrófagos utiliza estímulos inflamatórios clássicos, como lipopolissacarídeo, ou modelos associados à ativação inflamatória tecidual (18,22). Embora esses modelos sejam importantes para compreender a modulação de respostas inflamatórias induzidas por componentes bacterianos, eles não permitem avaliar isoladamente a influência do estresse oxidativo sobre a função macrofágica. Nesse sentido, o uso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como agente indutor de estresse oxidativo oferece uma abordagem complementar, pois permite investigar a resposta dos macrófagos frente a um estímulo redox controlado, sem associação direta a componentes bacterianos (11,12).

A linhagem J774A.1 é amplamente utilizada em estudos de biologia de macrófagos por apresentar características funcionais compatíveis com células macrofágicas, como capacidade fagocítica, resposta a estímulos inflamatórios e produção de mediadores solúveis (32-34). Ralph e Nakoinz (1975), descreveram propriedades fagocíticas e citolíticas de linhagem tumoral macrofágica murina, contribuindo para o desenvolvimento de modelos celulares voltados ao estudo da função macrofágica (33). Além disso, protocolos de isolamento e caracterização de macrófagos murinos reforçam a importância desses modelos para investigações de imunologia celular e resposta inflamatória (32).

Essa abordagem é relevante porque os efeitos da FBM dependem do tipo celular, do estado metabólico inicial, da presença de estresse, do comprimento de onda e da dose utilizada (13,15,23,28). Portanto, modelos celulares controlados ajudam a compreender mecanismos iniciais de ação da luz antes da realização de estudos pré-clínicos ou clínicos mais complexos (24,35).

Dessa forma, a investigação da FBM em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 pode contribuir para ampliar a compreensão sobre a interação entre luz, metabolismo celular, resposta inflamatória e equilíbrio redox. Ao avaliar desfechos como viabilidade metabólica, morfologia celular, $TNF-\alpha$ e IL-6, este modelo permite analisar se a FBM com laser de 780 nm é capaz de modular respostas celulares desencadeadas por diferentes intensidades de injúria oxidativa, fornecendo base experimental para estudos futuros no campo da Biofotônica.

1.6. Importância dos estudos experimentais *in vitro* em Biofotônica

Os estudos experimentais *in vitro* representam uma etapa fundamental na investigação de mecanismos celulares envolvidos na inflamação, no estresse oxidativo e na resposta a intervenções terapêuticas. Embora não reproduzam integralmente a complexidade de um organismo vivo, esses modelos permitem controlar variáveis importantes, como tipo celular, concentração do estímulo agressor, tempo de exposição, condições de cultivo, parâmetros de irradiação e períodos de análise (32-35). Dessa forma, esses modelos permitem avaliar, em condições controladas, a resposta celular frente a um estímulo agressor e identificar se uma intervenção específica é capaz de modificar parâmetros funcionais, metabólicos ou inflamatórios. No campo da Biofotônica, essa etapa é relevante para compreender efeitos celulares iniciais da FBM, orientar a escolha de parâmetros experimentais e subsidiar estudos posteriores em modelos biológicos mais complexos.

No campo da Biofotônica, os modelos *in vitro* são particularmente relevantes porque os efeitos da FBM dependem diretamente das características do sistema biológico avaliado. O tipo celular, o estado metabólico inicial, a presença ou ausência de estresse, o tipo de luz, o comprimento de onda, a potência, a energia entregue, a exposição radiante, o tempo de aplicação e a área irradiada podem influenciar a resposta obtida (13,15,23,28). Chung et al. (2012), destacam que a interpretação dos efeitos da FBM exige atenção aos parâmetros utilizados, pois pequenas variações dosimétricas podem modificar os resultados observados (28). Assim, estudos celulares controlados são importantes para compreender como protocolos específicos de FBM interferem em desfechos biológicos mensuráveis.

Esses achados reforçam a utilidade dos modelos celulares para investigar respostas iniciais à luz e orientar estudos posteriores em sistemas biológicos mais complexos.

Outro aspecto relevante dos estudos *in vitro* é a possibilidade de padronização metodológica e maior reprodutibilidade experimental. O uso de linhagens celulares estabelecidas, como J774A.1, permite trabalhar com populações relativamente homogêneas, em condições controladas de cultivo e exposição (32-34). Essa característica é importante em Biofotônica, pois a resposta à FBM pode ser influenciada por fatores como densidade celular, composição do meio de cultura, geometria do recipiente, distância entre a fonte de luz e as células, volume de meio e estado funcional das células no momento da irradiação (15,23,28,35). Portanto, a descrição e o controle dessas variáveis são fundamentais para a adequada interpretação dos resultados.

Ralph e Nakoinz (1975), descreveram propriedades fagocíticas e citolíticas de linhagem tumoral macrofágica murina, contribuindo para o desenvolvimento de modelos celulares voltados ao estudo da função macrofágica (33). Além disso, protocolos de isolamento e caracterização de macrófagos murinos reforçam a importância desses modelos para investigações relacionadas à imunologia celular, inflamação e resposta a diferentes estímulos (32).

Além disso, a utilização de diferentes concentrações de H_2O_2 possibilita simular distintos graus de estresse oxidativo e observar se a resposta celular à FBM varia conforme a intensidade da injúria. Essa abordagem é importante porque os efeitos da FBM são dependentes do estado funcional da célula e podem diferir entre condições de estresse leve, moderado ou intenso (13,15,23,28).

Assim, o modelo experimental adotado permite avaliar não apenas se a FBM exerce efeito modulador, mas também em quais condições esse efeito se manifesta de forma mais evidente.

Portanto, estudos *in vitro* não devem ser compreendidos como substitutos diretos de estudos pré-clínicos ou clínicos, mas como etapa complementar essencial para investigar mecanismos, testar hipóteses, definir parâmetros e compreender respostas celulares específicas (32-35).

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos em diversos processos de disfunção celular e tecidual, sendo frequentemente associados à manutenção de respostas inflamatórias persistentes e ao agravamento de condições crônicas (1,2,11,12). Os macrófagos participam diretamente desses processos, pois integram sinais inflamatórios e redox, produzem mediadores como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), e apresentam alterações funcionais diante de estímulos oxidativos (3-9,11,12). Dessa forma, compreender como essas células respondem ao estresse oxidativo é relevante para o estudo de mecanismos celulares relacionados à inflamação.

A literatura demonstra que a FBM pode modular parâmetros celulares relacionados à atividade mitocondrial, viabilidade celular, sinalização redox e produção de mediadores inflamatórios (13,15-21). Estudos prévios com macrófagos indicam que a FBM pode influenciar a atividade mitocondrial e marcadores inflamatórios em modelos experimentais controlados (18,19). Entretanto, grande parte das investigações utiliza modelos baseados em estímulos inflamatórios clássicos, como lipopolissacarídeo, ou modelos teciduais mais complexos, o que pode dificultar a análise isolada da resposta celular ao estresse oxidativo (18,22).

Nesse contexto, o uso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como agente indutor de estresse oxidativo permite investigar, de forma controlada, como macrófagos respondem a diferentes intensidades de agressão oxidativa (11,12). Esse modelo possibilita avaliar se a FBM é capaz de modular parâmetros funcionais importantes, como viabilidade metabólica, morfologia celular e produção de citocinas, sem a associação direta a estímulos bacterianos. Assim, a utilização de macrófagos J774A.1 expostos ao H₂O₂ representa uma estratégia experimental adequada para estudar a interação entre luz, estresse oxidativo e resposta inflamatória em ambiente *in vitro* (11,12,18,19,32-35).

A realização deste estudo se justifica pela necessidade de ampliar a compreensão dos efeitos celulares da FBM em condições de estresse oxidativo isolado. A análise de diferentes concentrações de H₂O₂ e de dois períodos de avaliação permite observar se a resposta à FBM varia conforme a intensidade da injúria e o tempo após a irradiação. Além disso, a avaliação conjunta de viabilidade metabólica, morfologia, TNF- α e IL-6 contribui para uma interpretação mais integrada da resposta dos macrófagos submetidos ao estresse oxidativo.

Portanto, este estudo pode contribuir para o campo da Biofotônica ao fornecer evidências experimentais sobre os efeitos da FBM com laser de 780 nm em macrófagos

J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Os resultados podem auxiliar na compreensão de mecanismos celulares iniciais relacionados à modulação inflamatória. Contudo, por se tratar de um estudo *in vitro*, os achados devem ser interpretados com cautela e não permitem extrapolação clínica direta.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da FBM com laser de 780 nm sobre a viabilidade metabólica, a morfologia celular e a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.

3.2. Específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade metabólica de macrófagos J774A.1 nos períodos de 24 e 48 horas.

Analisar o efeito da FBM com laser de 780 nm sobre a viabilidade metabólica de macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.

Descrever qualitativamente as alterações morfológicas dos macrófagos J774A.1 após exposição ao peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência de FBM.

Mensurar os níveis de proteína total no sobrenadante das culturas celulares para normalização dos dados de citocinas.

Avaliar os efeitos da FBM sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo.

Avaliar os efeitos da FBM sobre os níveis de interleucina 6 (IL-6) em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo.

4 METODOLOGIA

O presente estudo, de caráter experimental e *in vitro* foi integralmente desenvolvido nos Laboratórios de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), campus Vergueiro, São Paulo – SP. A infraestrutura institucional propiciou as condições adequadas para a manutenção das culturas celulares, aplicação do protocolo de FBM e realização das análises morfológicas, metabólicas e bioquímicas propostas.

Por se tratar de estudo experimental *in vitro*, realizado exclusivamente com linhagem celular estabelecida comercialmente, sem participação de seres humanos, uso de animais vivos ou obtenção de material biológico humano, não houve necessidade de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa ou à Comissão de Ética no Uso de Animais.

4.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi estruturado para avaliar os efeitos da FBM sobre macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂. As células foram distribuídas em grupos controle, grupos expostos a diferentes concentrações de H₂O₂ e grupos expostos ao H₂O₂ seguidos de FBM. Após os tratamentos, foram realizadas análises morfológicas, de viabilidade metabólica, proteína total e quantificação das citocinas TNF- α e IL-6 nos períodos de 24 e 48 horas. A sequência experimental está apresentada na Figura 1.

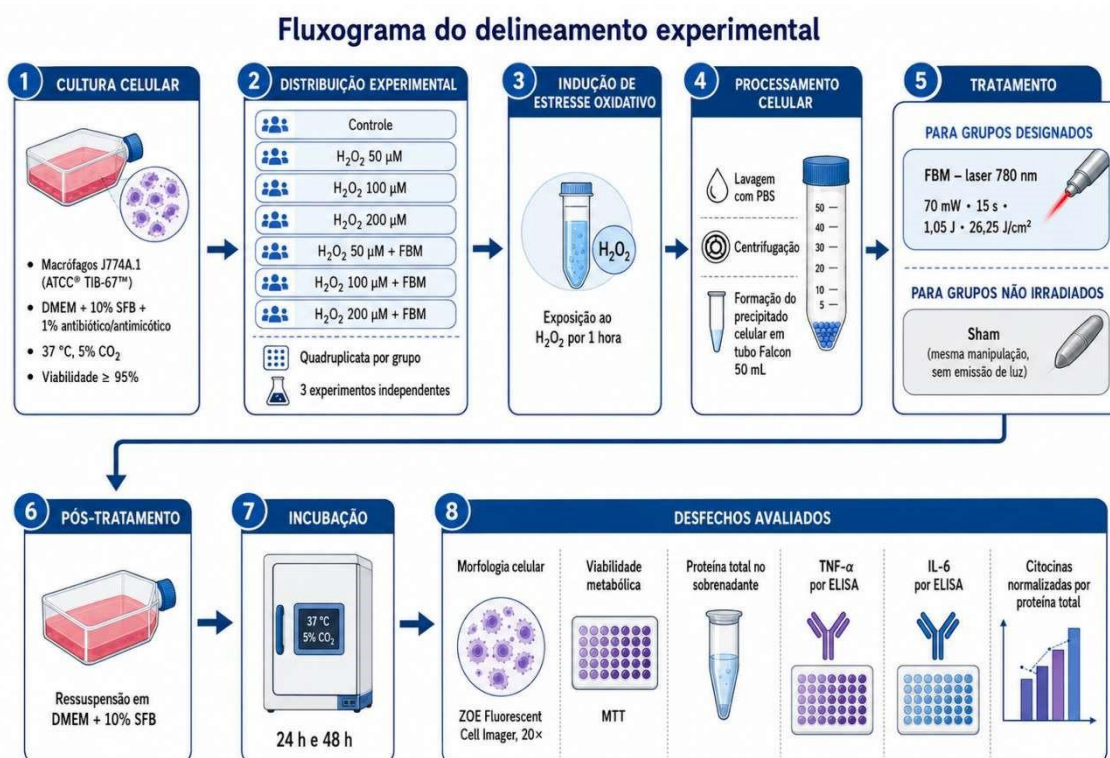


Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental. Macrófagos J774A.1 foram distribuídos em 7 grupos experimentais. Após exposição ao H₂O₂ por 1 hora, os grupos designados receberam FBM com laser de 780 nm. As células foram avaliadas após 24 e 48 horas. Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

4.2. Cultura celular

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas células da linhagem de macrófagos J774A.1 (ATCC® TIB-67™), derivadas de camundongos BALB/c, modelo documentado na literatura para estudos de biologia celular e imunologia (32,33,34).

As células foram mantidas e cultivadas em meio DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), com pH ajustado 7,4. O meio de cultivo foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), e 1 % de solução de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina). As culturas foram mantidas em incubadora (HEPA Class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA) em uma temperatura constante de 37 °C, sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

A viabilidade celular foi avaliada periodicamente por meio da contagem em câmara de Neubauer, utilizando o teste de exclusão pelo corante vital Azul de Trypan a 0,4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para a execução dos protocolos experimentais, foram rigorosamente utilizadas apenas culturas celulares que apresentaram índice de viabilidade igual ou superior a 95%.

4.3. Grupos experimentais

Para a avaliação dos efeitos da FBM sobre o estresse oxidativo, os macrófagos J774A.1 foram semeados em placas de micro titulação de 96 poços e distribuídos em sete grupos experimentais. Cada condição foi avaliada em quadruplicata ($n=4$) para os períodos experimentais de 24 e 48 horas.

Os níveis de estresse oxidativo foram mimetizados pela exposição ao H_2O_2 em três diferentes espectros de injúria celular: estresse leve ($50\ \mu M$), moderado ($100\ \mu M$) e intenso ($200\ \mu M$). Os grupos experimentais foram configurados conforme descrito a seguir:

- Controle: Macrófagos J774A.1 cultivados apenas em meio DMEM + 10% SFB, sem indução de estresse ou aplicação de FBM.
- $H_2O_2\ 50\ \mu M$: Células submetidas ao estresse oxidativo leve.
- $H_2O_2\ 100\ \mu M$: Células submetidas ao estresse oxidativo moderado.
- $H_2O_2\ 200\ \mu M$: Células submetidas ao estresse oxidativo intenso.
- $H_2O_2\ 50\ \mu M$ + FBM: Células submetidas ao estresse oxidativo leve tratadas com FBM
- $H_2O_2\ 100\ \mu M$ + FBM: Células submetidas ao estresse oxidativo moderado tratadas com FBM
- $H_2O_2\ 200\ \mu M$ + FBM: Células submetidas ao estresse oxidativo intenso tratadas com FBM

4.4. Tratamento das células com H₂O₂

Para a indução do estresse oxidativo, o meio de cultura basal foi removido e os macrófagos J774A.1 foram expostos às soluções de trabalho de H₂O₂ nas concentrações finais de 50, 100 e 200 µM. O período de incubação para o estabelecimento da injúria oxidativa foi de 1 hora, mantendo-se as condições padrão de incubação (37°C e 5% de CO₂).

Devido à alta instabilidade química e suscetibilidade à fotodegradação do H₂O₂, as soluções de trabalho foram rigorosamente preparadas imediatamente antes da sua aplicação em ambiente protegido da luz direta, a partir de uma solução estoque comercial de procedência certificada (Perfyl Tech), garantindo assim a precisão e a reprodutibilidade das concentrações estipuladas.

Decorrido o intervalo de 1 hora de exposição ao agente estressor, o meio contendo H₂O₂ foi integralmente aspirado, e as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salina (PBS) para remoção do H₂O₂ residual. Em seguida, as células foram removidas, transferidas para tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL e centrifugadas para formação do precipitado celular. Os grupos designados para tratamento foram então submetidos ao protocolo de FBM, conforme descrito a seguir. Após a irradiação ou manipulação simulada, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 ou 48 horas.

4.5. Tratamento das células utilizando a FBM

Decorrido o intervalo de 1 hora após a indução do estresse oxidativo pelo H₂O₂ e a respectiva troca do meio de cultura, os macrófagos J774A.1 foram submetidos a um único protocolo de irradiação. Para os procedimentos de fotobiomodulação, utilizou-se o equipamento comercial Twin-laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), operando em modo contínuo, cujos parâmetros dosimétricos encontram-se detalhados na Tabela 1.

O processo de irradiação foi realizado com as células dispostas em suspensão e centrifugadas na base de tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL. A ponteira do equipamento foi posicionada de forma estéril e perpendicular à base externa do tubo, garantindo que o feixe de luz incidisse de maneira direta e homogênea sobre o precipitado celular, minimizando perdas por dispersão ou atenuação óptica através do meio líquido.

A escolha dos parâmetros dosimétricos fundamentou-se em protocolos previamente estabelecidos, padronizados e validados pelo grupo de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica da UNINOVE para a modulação inflamatória e metabólica, inclusive da linhagem J774 (15,18,19,23,28,36). Visando anular qualquer

interferência de fontes de iluminação externa sobre as respostas celulares e garantir o controle experimental, todas as etapas de irradiação foram rigorosamente conduzidas em ambiente com baixa luminosidade (obscuridade parcial). Os grupos controle e estressados não tratados foram submetidos exatamente à mesma manipulação e variação ambiental, porém com o equipamento desligado (sham irradiation).

Tabela 1 - Parâmetros dosimétricos utilizados para o tratamento da FBM.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda (nm)	780
Largura espectral (nm)	10
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência (mW)	70
Diâmetro de abertura (cm)	0,23
Irradiância na abertura (mW/cm ²)	1750
Área do feixe (cm ²)	0,04
Tempo (s)	15
Exposição radiante (J/cm ²)	26,25
Número de pontos irradiados	1
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões	1
Energia total (J)	1,05

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

4.6. Morfologia celular

Para a avaliação da morfologia celular, as monocamadas de macrófagos J774A.1 de todos os grupos experimentais foram documentadas fotograficamente após os respectivos tratamentos, nos períodos de 24 e 48 horas. As imagens foram obtidas utilizando o sistema integrado de captura ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), sob ampliação fixa de 20x e em campo claro.

A análise qualitativa e comparativa das fotomicrografias baseou-se na observação de critérios estruturais indicativos de integridade ou injúria celular, tais como manutenção do formato celular, capacidade de adesão e espreadimento ao substrato plástico, densidade

da confluência celular e refringência de membrana. Também foram observadas alterações compatíveis com sofrimento celular, como vacuolização citoplasmática, retração de prolongamentos, arredondamento celular, descolamento e presença de debris celulares sugestivos de injúria induzida pelo estresse oxidativo.

4.7. Viabilidade celular – MTT

A viabilidade metabólica dos macrófagos J774A.1 foi determinada por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram semeadas em placas de microtitulação de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células por poço, e submetidas às análises nos períodos de 24 e 48 horas após os tratamentos. Cada condição experimental foi avaliada em quadruplicata, em três experimentos biológicos independentes.

Decorridos os respectivos períodos de incubação, o meio de cultura foi removido e a solução de MTT foi adicionada aos poços. As placas foram incubadas por 3 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, permitindo a redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas. Posteriormente, os cristais foram solubilizados mediante adição de isopropanol absoluto, sob agitação. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas Anthos 2020® (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância foram considerados proporcionais à atividade metabólica das células viáveis.

4.8. Normalização das amostras

Considerando que a exposição ao H₂O₂ pode reduzir a aderência e a viabilidade celular, os níveis de citocinas foram normalizados pela concentração de proteína total no sobrenadante, a fim de minimizar a influência de variações na quantidade de material celular entre os grupos experimentais.

Para isso, alíquotas de 2 µL do sobrenadante das culturas, coletadas nos períodos de 24 e 48 horas, foram dosadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A absorbância foi mensurada em 280 nm, e os valores de concentração proteica foram expressos em miligramas por mililitro (mg/mL). Esses valores foram utilizados como fator de correção matemática dos resultados brutos de TNF- α e IL-6 obtidos por ELISA. Após a normalização, os resultados finais das citocinas foram expressos em picogramas por miligrama de proteína (pg/mg de proteína).

4.9. Quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α por ELISA

A quantificação das citocinas TNF- α e IL-6 liberadas pelos macrófagos J774A.1 foi realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), utilizando kits comerciais BioLegend® (San Diego, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Foram utilizados os kits modelo 430901 para TNF- α e modelo 431301 para IL-6.

Para este ensaio, os sobrenadantes das culturas foram coletados nos períodos de 24 e 48 horas após os tratamentos, divididos em alíquotas e armazenados a -80 °C até o momento da análise. O procedimento foi realizado em três experimentos biológicos independentes.

As amostras e os padrões foram adicionados em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpos de captura. Após as etapas de incubação com anticorpos de detecção, adição da enzima horseradish peroxidase (HRP) e do substrato colorimétrico, a reação foi interrompida com solução de parada. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Anthos 2020® (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão de cada placa e posteriormente normalizadas pela concentração de proteína total no sobrenadante.

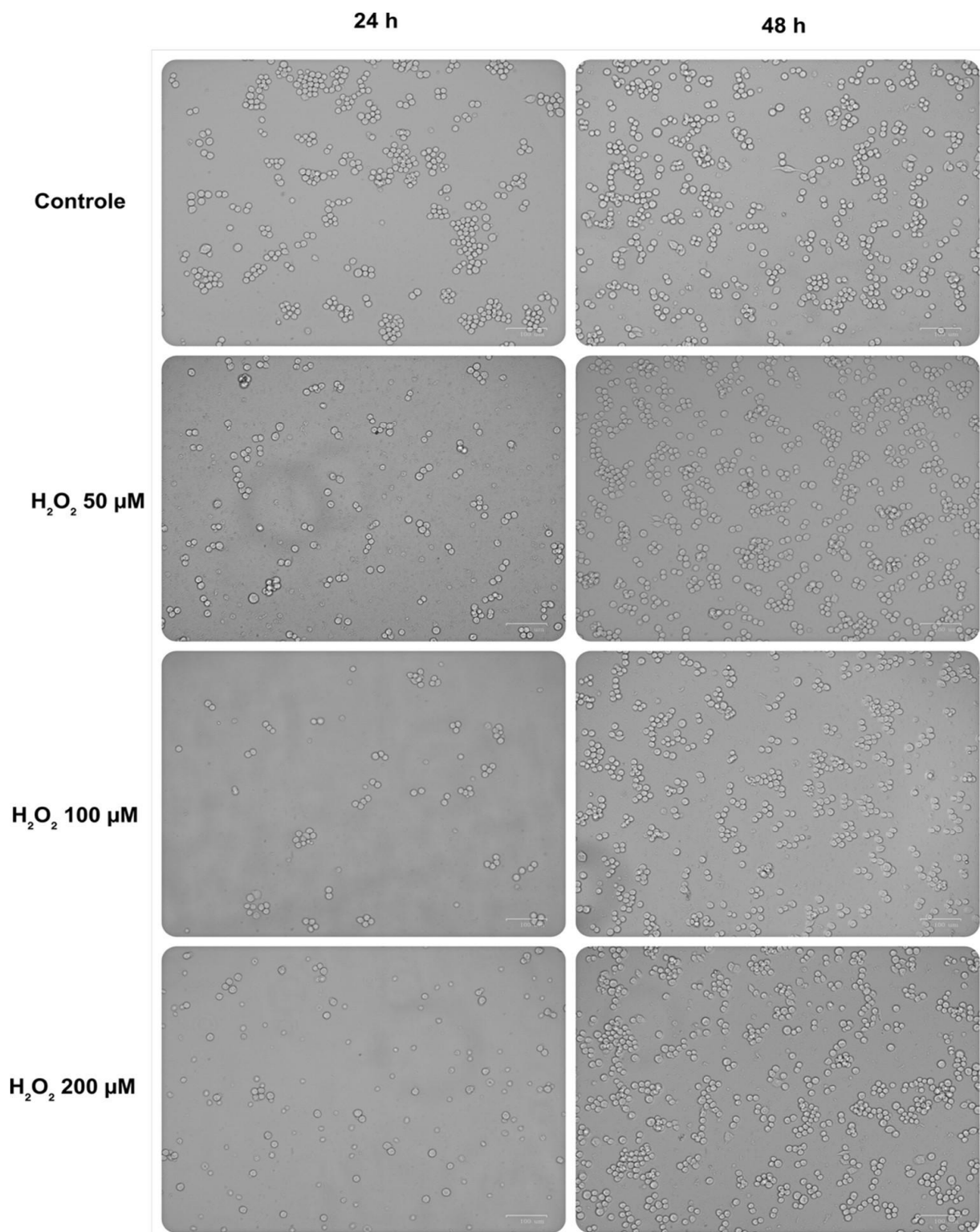
4.10. Análise estatística

A distribuição e a normalidade dos dados foram verificadas pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$), com intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8.01.

5 RESULTADOS

5.1. Morfologia celular

A análise morfológica dos macrófagos J774A.1 foi realizada nos períodos de 24 e 48 horas após os tratamentos, conforme apresentado na Figura 2.



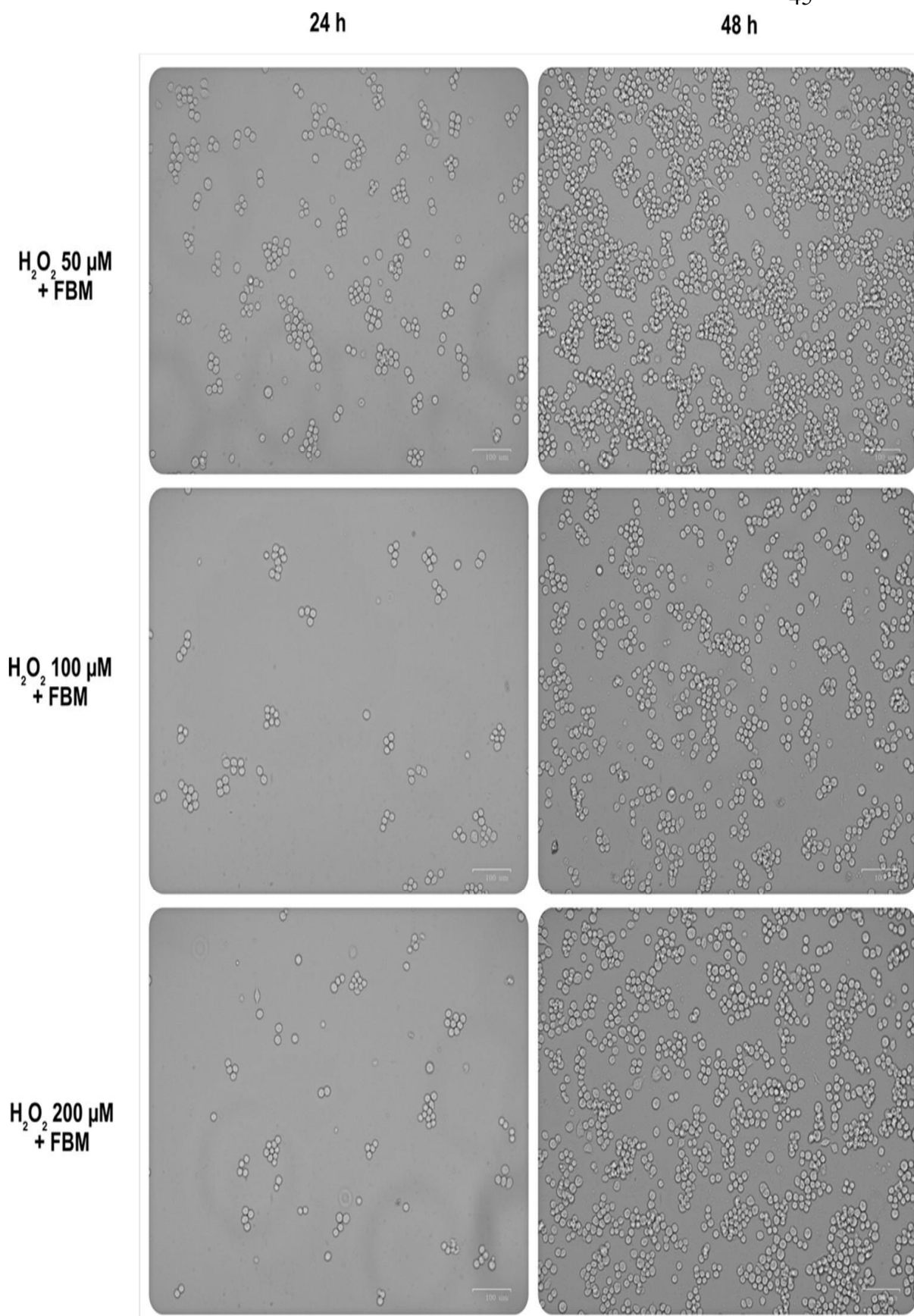


Figura 2 - Morfologia celular dos macrófagos J774A.1 nos grupos experimentais, avaliada por microscopia de luz (ZOE Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad, 20x, barra de escala = 100 μm). Observam-se alterações morfológicas nos grupos expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com maior evidência nas concentrações mais elevadas. Nos grupos submetidos à FBM, observa-se melhor preservação qualitativa da morfologia celular em comparação aos respectivos grupos não irradiados.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

No grupo controle, os macrófagos J774A.1 apresentaram morfologia compatível com células em cultura, com distribuição homogênea, aderência ao substrato e organização da monocamada. Nos grupos expostos ao H_2O_2 , foram observadas alterações morfológicas qualitativas, incluindo redução da organização da monocamada, arredondamento celular, menor aderência e presença de debris celulares, especialmente nas maiores concentrações de H_2O_2 . Nos grupos submetidos à FBM, observou-se melhor preservação qualitativa da morfologia celular em comparação aos respectivos grupos expostos apenas ao H_2O_2 . Esse padrão foi caracterizado por maior manutenção da aderência celular, melhor organização da monocamada e menor presença aparente de debris celulares. No grupo H_2O_2 200 μM + FBM, embora ainda sejam observadas alterações morfológicas associadas ao estresse oxidativo, a injúria celular parece qualitativamente menos acentuada em comparação ao grupo H_2O_2 200 μM sem FBM.

5.2. Viabilidade Celular – MTT

Os resultados referentes à viabilidade dos macrófagos J774A.1 obtidos em três experimentos independentes estão demonstrados na Figura 3.

viabilidade metabólica dos macrófagos J774A.1 foi avaliada pelo ensaio de MTT nos períodos de 24 e 48 horas após os tratamentos, conforme apresentado na Figura 3.

Em 24 horas (Figura 3A), os grupos expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentaram redução significativa da viabilidade metabólica em comparação ao grupo controle. Essa redução foi observada nas concentrações de 50 μM , 100 μM e 200 μM , indicando efeito citotóxico associado à exposição ao H_2O_2 . Entre os grupos submetidos à FBM, observou-se aumento significativo da viabilidade metabólica nos grupos H_2O_2 50 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM em comparação aos respectivos grupos expostos apenas ao H_2O_2 . No entanto, o grupo H_2O_2 200 μM + FBM permaneceu com viabilidade inferior à do grupo controle. Em 48 horas (Figura 3B), os grupos expostos ao H_2O_2 nas concentrações de 50 μM , 100 μM e 200 μM permaneceram com viabilidade metabólica significativamente reduzida em relação ao grupo controle. Os grupos H_2O_2 100 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM também apresentaram valores inferiores ao controle. Entretanto, nesse período, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos ao H_2O_2 e seus respectivos grupos submetidos à FBM.

Assim, os resultados indicam que a FBM esteve associada ao aumento da viabilidade metabólica em condições específicas no período de 24 horas, especialmente nos grupos H_2O_2 50 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM. Esse efeito não foi observado de forma significativa no período de 48 horas.

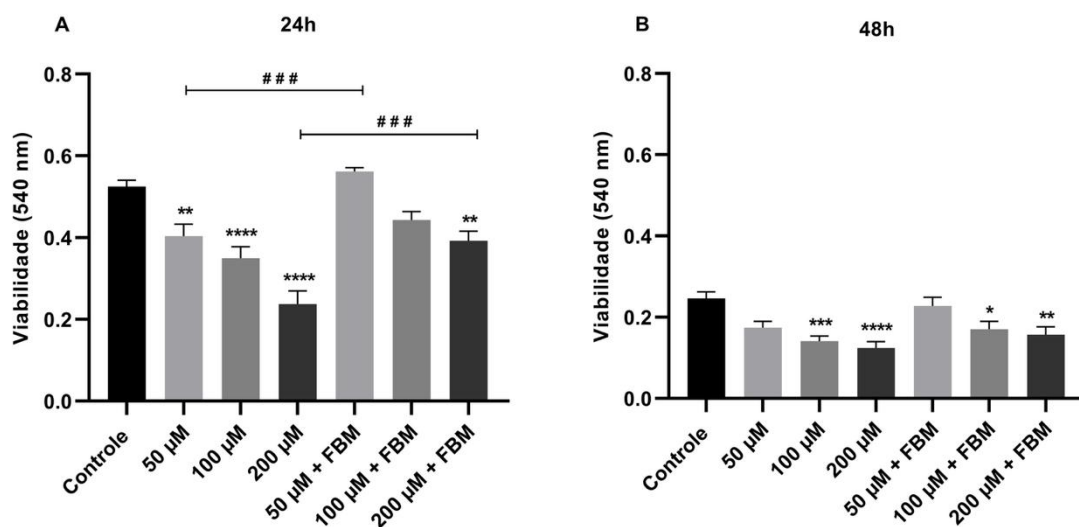


Figura 3. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 expostos ao H_2O_2 e/ou à FBM após 24 h (A) e 48 h (B), avaliada pelo ensaio de MTT, expressa em porcentagem relativa ao controle (painel superior) e densidade óptica a 540 nm (painel inferior). *Diferenças em relação ao controle; # diferenças entre grupos da mesma concentração. ANOVA/Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$. Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

5.3. Quantificação de Proteína Total

Os níveis de proteína total no sobrenadante das culturas celulares foram avaliados após 24 e 48 horas de incubação, conforme apresentado na Figura 4. Em 24 horas (Figura 4A), as concentrações de proteína total foram semelhantes entre o grupo controle, os grupos expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os grupos submetidos à FBM, sem diferenças estatisticamente significativas. Esse mesmo padrão foi observado em 48 horas (Figura 4B), período no qual os níveis de proteína total também permaneceram semelhantes entre os grupos experimentais.

A quantificação de proteína total foi realizada no sobrenadante das culturas celulares com o objetivo de normalizar matematicamente os dados de $TNF-\alpha$ e IL6 obtidos por ELISA. Dessa forma, esse parâmetro não deve ser interpretado como medida de síntese proteica intracelular, proliferação celular ou massa celular total.

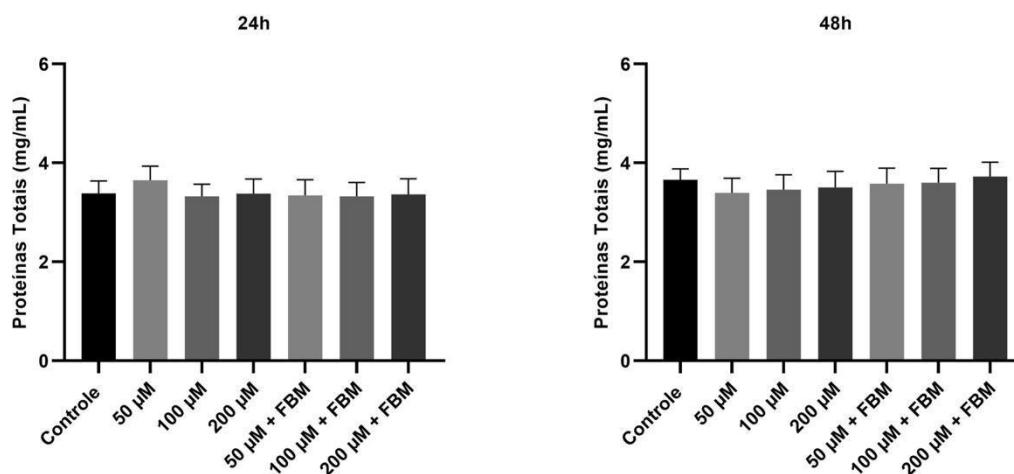


Figura 4 - Quantificação de proteína total no sobrenadante de culturas de macrófagos J774A.1 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação. Os dados são expressos em mg/mL e apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

5.4. Níveis de IL-6

Os níveis de interleucina 6 (IL-6) no sobrenadante das culturas celulares foram avaliados após 24 e 48 horas de incubação, conforme apresentado na Figura 5.

Em 24 horas (Figura 5A), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Esse resultado indica que, nesse período, a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nas concentrações avaliadas, não promoveu alteração significativa nos níveis de IL-6, assim como a FBM não modificou significativamente esse parâmetro em comparação aos respectivos grupos não irradiados.

Em 48 horas (Figura 5B), o grupo H_2O_2 200 µM + FBM apresentou níveis de IL-6 significativamente maiores em comparação ao grupo H_2O_2 200 µM sem FBM. Considerando a natureza pleiotrópica da IL-6, esse aumento não deve ser interpretado diretamente como efeito benéfico ou pró-regenerativo. No contexto do modelo experimental utilizado, esse achado pode sugerir preservação parcial da atividade funcional e secretora das células submetidas à FBM sob condição de estresse oxidativo mais intenso.

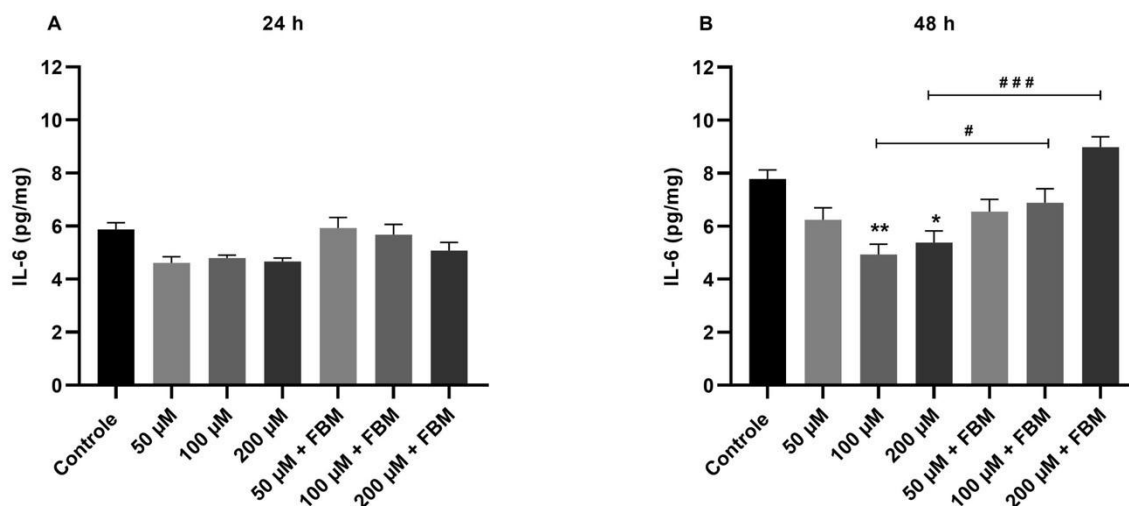


Figura 5 - Níveis de IL-6 em macrófagos J774A.1 nos diferentes grupos experimentais após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle indicadas por asteriscos (*); diferenças entre grupos da mesma concentração indicadas por hashtag (#). ANOVA/Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

5.5. Níveis de TNF- α

Os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no sobrenadante das culturas celulares foram avaliados após 24 e 48 horas de incubação, conforme apresentado na Figura 6.

Em 24 horas (Figura 6A), os grupos H_2O_2 100 μM e H_2O_2 200 μM apresentaram aumento significativo dos níveis de TNF- α em comparação ao grupo controle. Esse resultado indica que, nesse período, as concentrações moderada e elevada de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) induziram aumento desse mediador inflamatório. Nos grupos submetidos à FBM, observou-se redução significativa dos níveis de TNF- α em comparação aos respectivos grupos expostos apenas ao H_2O_2 , indicando modulação desse mediador após a irradiação.

Em 48 horas (Figura 6B), os grupos H_2O_2 50 μM , H_2O_2 100 μM e H_2O_2 200 μM apresentaram níveis de TNF- α significativamente maiores em comparação ao grupo controle. O maior valor foi observado no grupo H_2O_2 200 μM , sugerindo intensificação da resposta inflamatória associada à maior concentração do agente oxidativo. Nos grupos submetidos à FBM, houve redução significativa dos níveis de TNF- α em comparação aos respectivos grupos não irradiados, com valores próximos aos observados no grupo controle.

Dessa forma, os resultados indicam que a exposição ao H_2O_2 aumentou os níveis de TNF- α , especialmente nas maiores concentrações e no período de 48 horas. A FBM esteve

associada à redução desse mediador nos grupos irradiados, sugerindo modulação da resposta inflamatória induzida pelo estresse oxidativo neste modelo experimental.

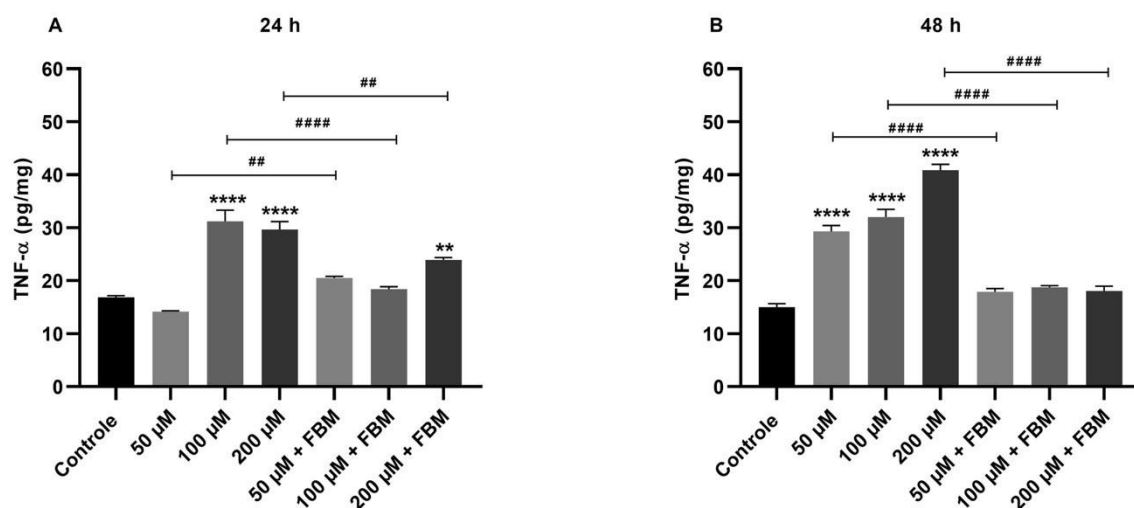


Figura 6 - Níveis de TNF- α em macrófagos J774A.1 nos diferentes grupos experimentais após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas em relação ao controle indicadas por asteriscos (*); diferenças entre grupos da mesma concentração indicadas por hashtag (#). ANOVA/Tukey: ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da FBM com laser de 780 nm sobre a morfologia celular, a viabilidade metabólica e os níveis de TNF- α e IL-6 em macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). De modo geral, os resultados demonstraram que a exposição ao H₂O₂ promoveu alterações morfológicas, redução da viabilidade metabólica e aumento dos níveis de TNF- α , especialmente nas maiores concentrações e no período de 48 horas. A FBM esteve associada à melhor preservação qualitativa da morfologia celular, ao aumento da viabilidade metabólica em condições específicas no período de 24 horas, à redução dos níveis de TNF- α nos grupos irradiados e à manutenção de níveis mais elevados de IL-6 no grupo submetido ao estresse oxidativo mais intenso após 48 horas.

Esses achados são coerentes com a relação descrita entre inflamação, estresse oxidativo e função macrofágica. A inflamação crônica envolve ativação sustentada de células imunes, produção de citocinas e participação de mediadores oxidativos, contribuindo para disfunção celular e perpetuação de respostas inflamatórias (1,2). Os macrófagos exercem papel central nesse processo, pois participam da iniciação, amplificação e resolução da inflamação, além de integrarem sinais provenientes do microambiente, incluindo estímulos inflamatórios e alterações redox (3-6). Nesse contexto, modelos experimentais com macrófagos permitem investigar como estímulos oxidativos afetam parâmetros celulares e como intervenções moduladoras, como a FBM, podem interferir nessa resposta.

O uso do H₂O₂ como agente indutor de estresse oxidativo permitiu avaliar a resposta dos macrófagos a uma injúria oxidativa controlada. Estudos prévios demonstram que o H₂O₂ pode modificar a expressão de genes inflamatórios em macrófagos e ativar vias associadas ao desequilíbrio redox, justificando sua utilização em modelos *in vitro* de estresse oxidativo (11,12). No presente estudo, a exposição ao H₂O₂ resultou em alterações morfológicas qualitativas e redução da viabilidade metabólica, especialmente nas maiores concentrações, indicando que o protocolo foi capaz de induzir diferentes graus de comprometimento celular. Esses resultados reforçam a adequação do modelo experimental para avaliar os efeitos da FBM em condições de estresse oxidativo. A redução da viabilidade metabólica observada nos grupos expostos ao H₂O₂ é compatível com o efeito do estresse oxidativo sobre a função celular. Pomari et al. (2014) (11): mostraram que o H₂O₂ modifica a expressão de genes inflamatórios em macrófagos, em um modelo que também evidencia comprometimento celular associado ao estresse oxidativo Begum et al. (2020)(12): usaram H₂O₂ para induzir estresse oxidativo em células RAW 264.7 (outra linhagem de macrófago

murino), demonstrando redução de viabilidade/dano celular que era revertido por mecanismos protetores (via Nrf2/MAPK).

O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio capaz de atravessar membranas celulares e, em concentrações elevadas, contribuir para disfunção mitocondrial, dano a componentes celulares e alteração de vias inflamatórias (11,12). No presente estudo, a redução da viabilidade foi observada em todas as concentrações avaliadas, tanto em 24 quanto em 48 horas, com maior comprometimento nos grupos submetidos às maiores concentrações de H_2O_2 . Esse padrão sugere efeito dependente da intensidade da injúria oxidativa sobre a atividade metabólica dos macrófagos J774A.1.

O ensaio de MTT, utilizado para avaliação da viabilidade metabólica, baseia-se na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem o sal de tetrazólio em cristais de formazan (7). Portanto, os resultados obtidos por esse método devem ser interpretados como indicativos de atividade metabólica celular, e não como medida direta de proliferação. Essa distinção é importante no presente estudo, uma vez que a FBM aumentou significativamente a viabilidade metabólica em condições específicas no período de 24 horas, particularmente nos grupos H_2O_2 50 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM, mas esse efeito não se manteve de forma significativa no período de 48 horas.

Os efeitos da FBM sobre a viabilidade metabólica observados em 24 horas podem estar relacionados à modulação da atividade mitocondrial. Estudos prévios demonstram que a FBM pode interferir na função mitocondrial, no potencial de membrana mitocondrial e na síntese de adenosina trifosfato, especialmente por meio da interação da luz com cromóforos mitocondriais, como a citocromo c oxidase (15-17). Souza et al. (2015), observaram que a FBM modulou a atividade mitocondrial de macrófagos, enquanto Fernandes et al. (2015), demonstraram efeitos da irradiação com lasers de 660 nm e 780 nm sobre marcadores inflamatórios em células J774 ativadas (18,19). Esses achados sustentam a hipótese de que a FBM pode modificar respostas metabólicas e funcionais de macrófagos em condições experimentais específicas.

A ausência de diferença significativa entre os grupos H_2O_2 e H_2O_2 + FBM no período de 48 horas indica que o efeito observado sobre a viabilidade metabólica não foi sustentado em todos os tempos avaliados. Esse resultado reforça a natureza dependente do tempo, da dose e do estado celular na resposta à FBM. A literatura destaca que os efeitos da FBM podem variar conforme comprimento de onda, energia, irradiância, exposição radiante, tipo celular, presença de estresse e janela temporal de análise (13,15,23,28). Assim, os achados deste estudo sugerem que a modulação da viabilidade metabólica pela FBM ocorreu de maneira específica, sem permitir afirmar efeito citoprotetor contínuo ou generalizado.

A análise morfológica qualitativa complementa os achados de viabilidade metabólica. Os grupos expostos ao H_2O_2 apresentaram alterações compatíveis com injúria celular, incluindo menor organização da monocamada, arredondamento celular, redução da aderência e presença de debris celulares, especialmente nas maiores concentrações. Nos grupos submetidos à FBM, observou-se melhor preservação qualitativa da morfologia em comparação aos respectivos grupos não irradiados. Esse achado é coerente com a literatura que descreve a FBM como moduladora de processos celulares relacionados à função mitocondrial, sinalização redox e adaptação ao estresse (13,15,17,19). No entanto, por se tratar de avaliação qualitativa, esses resultados devem ser interpretados como indicativos morfológicos e não como confirmação de mecanismos específicos de morte celular, como apoptose ou necrose.

Em relação aos níveis de $TNF-\alpha$, os resultados demonstraram aumento significativo dessa citocina nos grupos expostos ao H_2O_2 , especialmente nas concentrações de 100 μM e 200 μM em 24 horas, e em todas as concentrações avaliadas no período de 48 horas. Esse achado indica que o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 foi capaz de estimular a produção desse mediador inflamatório em macrófagos J774A.1. O $TNF-\alpha$ é uma citocina associada à amplificação da resposta inflamatória, ao recrutamento de células imunes e à ativação de vias próinflamatórias, sendo frequentemente utilizada como marcador funcional da atividade inflamatória de macrófagos (7,9).

A relação entre estresse oxidativo e aumento de $TNF-\alpha$ pode ser explicada pela capacidade das espécies reativas de oxigênio de interferirem em vias de sinalização intracelular relacionadas à inflamação. Estudos prévios demonstram que o H_2O_2 pode modificar a expressão de genes inflamatórios em macrófagos, reforçando a associação entre desequilíbrio redox e resposta inflamatória celular

(11). Além disso, Begum et al. (2020), demonstraram que modelos de estresse oxidativo induzido por H_2O_2 em células macrofágicas envolvem vias como fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 e proteínas quinases ativadas por mitógenos, evidenciando que esse estímulo pode alterar mecanismos celulares relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo (12).

Nos grupos submetidos à FBM, observou-se redução significativa dos níveis de $TNF-\alpha$ em comparação aos respectivos grupos expostos apenas ao H_2O_2 . Esse resultado sugere que a FBM modulou a produção desse mediador inflamatório no modelo experimental utilizado. Esse achado está de acordo com estudos prévios que demonstraram efeitos anti-inflamatórios da FBM em diferentes modelos experimentais. Hamblin (2017), descreveu que a FBM pode modular mediadores inflamatórios, células imunes e vias envolvidas na resolução da inflamação (13). Aimbire et al. (2006), observaram redução

dose-dependente de TNF- α após aplicação de laser de baixa potência em modelo de inflamação aguda, enquanto Oliveira et al. (2014), demonstraram que a terapia com luz reduziu parâmetros inflamatórios em modelo de inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (20,22).

Estudos com macrófagos também sustentam a interpretação de que a FBM pode modular respostas inflamatórias celulares. Fernandes et al. (2015), demonstraram que lasers de 660 nm e 780 nm foram capazes de modular marcadores inflamatórios em células J774 ativadas, indicando que essa linhagem celular responde à irradiação em parâmetros específicos (18). Souza et al. (2015), também observaram modulação da atividade mitocondrial de macrófagos após aplicação de FBM, o que reforça a participação de mecanismos bioenergéticos na resposta celular à luz (19). No presente estudo, a redução de TNF- α nos grupos irradiados pode estar relacionada à modulação da atividade mitocondrial, da sinalização redox e de vias inflamatórias associadas ao estresse oxidativo.

É importante destacar que a redução de TNF- α observada neste estudo não deve ser interpretada como bloqueio completo da resposta inflamatória, mas como modulação desse mediador em um modelo *in vitro* de injúria oxidativa. A FBM esteve associada à redução dos níveis de TNF- α tanto em 24 quanto em 48 horas, com valores próximos ao controle nos grupos irradiados. Esse padrão sugere que, sob as condições experimentais utilizadas, a FBM com laser de 780 nm interferiu na resposta inflamatória induzida pelo H₂O₂, especialmente em relação ao TNF- α .

A resposta da IL-6 apresentou comportamento distinto daquele observado para o TNF- α . Em 24 horas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, indicando que, nesse período, o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂ e a aplicação da FBM não modificaram significativamente os níveis dessa citocina. Em 48 horas, entretanto, o grupo H₂O₂ 200 μ M + FBM apresentou níveis significativamente maiores de IL-6 em comparação ao grupo H₂O₂ 200 μ M sem FBM, sugerindo que a FBM interferiu na manutenção desse mediador sob condição de estresse oxidativo mais intenso.

A interpretação desse resultado deve ser realizada com cautela, pois a IL6 apresenta comportamento pleiotrópico e dependente do contexto biológico. Embora seja frequentemente associada à resposta inflamatória, essa citocina também pode participar de processos regulatórios e adaptativos, dependendo do tipo celular, do microambiente e do momento da análise (9). Dessa forma, o aumento relativo de IL-6 no grupo H₂O₂ 200 μ M + FBM não deve ser interpretado de forma direta como efeito pró-inflamatório, benéfico ou pró-regenerativo, mas como um achado funcional relacionado ao comportamento das células irradiadas nesse modelo experimental.

Nos grupos submetidos ao estresse oxidativo mais intenso sem FBM, a redução dos níveis de IL-6 em 48 horas pode estar relacionada ao comprometimento funcional dos macrófagos, considerando que o H₂O₂ reduziu a viabilidade metabólica e induziu alterações morfológicas mais evidentes nas maiores concentrações. Estudos prévios demonstram que o H₂O₂ pode alterar a expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos e comprometer vias celulares relacionadas ao equilíbrio redox e à resposta ao estresse (11,12). Nesse contexto, a manutenção de níveis mais elevados de IL-6 no grupo H₂O₂ 200 µM + FBM pode sugerir preservação parcial da atividade secretora das células irradiadas sob condição de injúria oxidativa intensa.

Esse achado também pode ser analisado à luz dos mecanismos propostos para a FBM. A literatura descreve que a FBM pode modular a atividade mitocondrial, a produção de adenosina trifosfato, a sinalização redox e vias intracelulares relacionadas à adaptação celular ao estresse (13,15-17,21). Souza et al. (2015), observaram modulação da atividade mitocondrial de macrófagos após FBM, e Fernandes et al. (2015), demonstraram que a irradiação com lasers de 660 nm e 780 nm pode interferir em marcadores inflamatórios em células J774 ativadas (18,19). Assim, a manutenção da IL-6 no grupo irradiado pode estar relacionada à preservação parcial da funcionalidade celular, e não necessariamente à amplificação da inflamação.

Portanto, os resultados referentes à IL-6 indicam que a resposta dessa citocina foi dependente do tempo, da intensidade do estresse oxidativo e da aplicação da FBM. Diferentemente do TNF- α , que apresentou redução consistente nos grupos irradiados, a IL-6 não se comportou como marcador linear de inflamação neste modelo. Esse resultado reforça a necessidade de interpretar citocinas de maneira contextualizada, considerando simultaneamente viabilidade metabólica, morfologia celular e condições experimentais.

A quantificação de proteína total no sobrenadante foi utilizada como estratégia de normalização dos níveis de TNF- α e IL-6 obtidos por ELISA. No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de proteína total entre os grupos experimentais, tanto em 24 quanto em 48 horas. Esse resultado indica que a normalização das citocinas por proteína total foi realizada sobre valores relativamente semelhantes entre os grupos, contribuindo para maior comparabilidade dos dados de TNF- α e IL-6.

Entretanto, é importante destacar que a proteína total foi mensurada no sobrenadante das culturas celulares e utilizada exclusivamente como fator de correção matemática dos resultados de citocinas. Dessa forma, esse parâmetro não deve ser interpretado como medida de síntese proteica intracelular, proliferação celular ou massa celular total. Essa distinção é relevante porque, em modelos submetidos ao estresse oxidativo, alterações na

viabilidade, na aderência e na integridade celular podem interferir na quantidade de material celular e nos mediadores liberados no sobrenadante. Assim, a normalização contribuiu para reduzir a influência dessas variações na interpretação dos níveis de citocinas.

A análise conjunta dos resultados demonstra que o H_2O_2 promoveu resposta compatível com estresse oxidativo em macrófagos J774A.1, caracterizada por alterações morfológicas qualitativas, redução da viabilidade metabólica e aumento dos níveis de TNF- α . Esses achados estão de acordo com estudos que descrevem o H_2O_2 como agente capaz de induzir desequilíbrio redox e modificar respostas inflamatórias em macrófagos (11,12). Além disso, reforçam a relação entre estresse oxidativo e inflamação, uma vez que espécies reativas podem atuar como mediadores de sinalização celular e influenciar a produção de citocinas (8,11,12,21).

Nos grupos submetidos à FBM, observou-se melhor preservação qualitativa da morfologia celular, aumento da viabilidade metabólica em condições específicas no período de 24 horas, redução dos níveis de TNF- α e manutenção de níveis mais elevados de IL-6 no grupo submetido ao estresse oxidativo mais intenso após 48 horas. Esses achados sugerem que a FBM atuou como moduladora da resposta celular ao estresse oxidativo, e não como supressora inespecífica da atividade inflamatória. Essa interpretação é coerente com a literatura que descreve a FBM como uma intervenção capaz de modular atividade mitocondrial, sinalização redox e mediadores inflamatórios, com efeitos dependentes do tipo celular, da dose utilizada, do estado funcional da célula e do tempo de avaliação (13,15,18,19,23,28).

Assim, os resultados deste estudo indicam que a FBM com laser de 780 nm interferiu em parâmetros relevantes da resposta de macrófagos J774A.1 ao estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . A redução de TNF- α foi o achado inflamatório mais consistente, enquanto os efeitos sobre viabilidade metabólica e IL-6 ocorreram de forma dependente da condição experimental e do tempo de análise. Esse comportamento reforça a necessidade de interpretar os efeitos da FBM de maneira contextualizada, considerando que a resposta celular à luz pode variar conforme a intensidade da injúria oxidativa e o momento da avaliação.

Como limitações, destaca-se que este estudo foi realizado exclusivamente em modelo experimental, *in vitro* utilizando uma linhagem celular murina imortalizada. Embora esse modelo permita maior controle das condições experimentais, ele não reproduz integralmente a complexidade de um tecido vivo, no qual diferentes tipos celulares, matriz extracelular, vascularização, mediadores sistêmicos e interações imunológicas podem influenciar a resposta à FBM. Outra limitação refere-se aos desfechos avaliados. A análise

morfológica foi qualitativa, sem quantificação automatizada de área celular, confluência ou número de células aderidas. A viabilidade foi avaliada pelo ensaio de MTT, que reflete atividade metabólica celular, mas não diferencia diretamente proliferação, morte celular, apoptose ou necrose. Além disso, a investigação da resposta inflamatória foi baseada nos níveis de TNF- α e IL-6 no sobrenadante, sem avaliação de expressão gênica, vias intracelulares de sinalização, marcadores adicionais de estresse oxidativo ou mediadores relacionados à polarização macrofágica. Dessa forma, os resultados permitem interpretar a resposta celular de maneira funcional, mas não esclarecem completamente os mecanismos moleculares envolvidos.

Apesar dessas limitações, os achados fornecem subsídios importantes para a compreensão dos efeitos da FBM em macrófagos submetidos ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂.

Estudos futuros devem incluir diferentes parâmetros dosimétricos, avaliação de curvas dose-resposta, análise de outros tempos experimentais e investigação de marcadores adicionais relacionados à função mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose, necrose e vias inflamatórias

. Também são necessários estudos em modelos pré-clínicos mais complexos, capazes de avaliar se os efeitos observados neste modelo celular se mantêm em sistemas biológicos com maior interação entre células, tecidos e mediadores inflamatórios.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a FBM com laser de 780 nm modulou a resposta de macrófagos J774A.1 submetidos ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em um modelo experimental *in vitro*.

A exposição ao H_2O_2 promoveu alterações morfológicas qualitativas, redução da viabilidade metabólica e aumento dos níveis de TNF- α , especialmente nas maiores concentrações e no período de 48 horas, confirmando a indução de um modelo de lesão oxidativa celular.

A FBM esteve associada à melhor preservação qualitativa da viabilidade metabólica em condições específicas no período de 24 horas, principalmente nos grupos H_2O_2 50 μM + FBM e H_2O_2 200 μM + FBM.

Em relação às citocinas, a FBM reduziu os níveis de TNF- α nos grupos irradiados em comparação aos respectivos grupos expostos apenas ao H_2O_2 , indicando modulação desse mediador inflamatório. Para IL-6, não foram observadas diferenças significativas em 24 horas; em 48 horas, o grupo H_2O_2 200 μM + FBM apresentou níveis mais elevados em comparação ao respectivo grupo não irradiado, achado que pode sugerir preservação parcial da atividade secretora celular sob estresse oxidativo intenso.

Dessa forma, os achados indicam que a FBM não atuou como supressora inespecífica da resposta inflamatória, mas como moduladora de parâmetros metabólicos, morfológicos e inflamatórios em condições específicas de estresse oxidativo. Por se tratar de um estudo *in vitro*, os resultados não permitem extrapolação clínica direta, mas fornecem subsídios para futuras investigações em modelos pré-clínicos mais complexos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Furman D, Campisi J, Verdin E, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019;25(12):1822-1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.
2. Luo H. Global burden and cross-country inequalities in six major immunemediated inflammatory diseases from 1990 to 2021. *Autoimmun Rev*. 2024;23(10):103639. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2024.103639>. Acesso em: 16 jun. 2026.
3. Lee JW, Chun W, Lee HJ, et al. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Cells*. 2021;10(4):897. doi: 10.3390/cells10040897.
4. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 2019;129(7):2619-2628. doi: 10.1172/JCI124615.
5. Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:567-592. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034348.
6. Chiu S, Bharat A. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):239-245. doi: 10.1097/MOT.0000000000000313.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
8. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-228. doi: 10.1126/science.1373522.
9. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-508. doi: 10.1378/chest.118.2.503.

10. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.
11. Pomari E, Stefanon B, Colitti M. Effect of plant extracts on H₂O₂-induced inflammatory gene expression in macrophages. *J Inflamm Res*. 2014;7:103-112. doi: 10.2147/JIR.S61471.
12. Begum R, Kim CS, Fadrique A, et al. Molecular hydrogen protects against oxidative stress-induced RAW 264.7 macrophage cells through the activation of Nrf2 and inhibition of MAPK signaling pathway. *Mol Cell Toxicol*. 2020;16:103-118. doi: 10.1007/s13273-020-00074-w.
13. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-361.
14. Hamblin MR. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. *J Neurosci Res*. 2018;96(4):731-743. doi: 10.3934/biophy.2017.3.337.
15. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016;22(3):7000417. doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201.
16. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999;49(1):1-17. doi: 10.1016/S10111344(98)00219-X.
17. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):411-416. doi: 10.1111/php.12397.
18. Fernandes KPS, Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, et al. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;153:344-351. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.015.

19. Souza NHC, Ferrari RAM, Silva DFT, et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther.* 2014;18:308-314. doi: 10.1590/bjpt-rbf.2014.0048.
20. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(1):33-37. doi: 10.1089/pho.2006.24.33.
21. Chen AC, Arany PR, Huang YY, et al. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* 2011;6(7):e22453. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.
22. Oliveira MC Jr, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B.* 2014;134:57-63. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.03.001.
23. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci.* 2014;5(2):58-62. PMID: 25653800; PMCID: PMC4291815.
24. dos Santos Malavazzi TC, Fernandes KPS, Lopez TCC, et al. Effects of the invasive and non-invasive systemic photobiomodulation using low-level laser in experimental models: A systematic review. *Lasers Med Sci.* 2023;38:137. doi: 10.1007/s10103-023-03799-x.
25. dos Santos TC, de Brito Sousa K, Andreo L, et al. Effect of Photobiomodulation on C2C12 Myoblasts Cultivated in M1 Macrophage-conditioned Media. *Photochem Photobiol.* 2020;96(4):906-916. doi: 10.1111/php.13215.
26. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(4):355-361. doi: 10.1089/pho.2005.23.355.
27. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(4):183-184. doi: 10.1089/pho.2015.9848.

28. Chung H, Dai T, Sharma SK, et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-533.
29. Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira Cardoso V, et al. Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells. *Lasers Med Sci.* 2015;30:2209-2213. doi: 10.1007/s10103-015-1775-4.
30. Gregio VA, Martinelli A, Malavazzi TCDS, et al. Photobiomodulation and aquatic training reduce TNF- α expression and enhance muscle fiber area in Wistar rats. *Lasers Med Sci.* 2025;40:47. doi: 10.1007/s10103-025-04290-5.
31. Woo J, Shin H, Kim H, et al. Reprogramming macrophage phenotypes with photobiomodulation for enhanced inflammation control in ENT organ tissues. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2024;17(4):297-307. doi: 10.21053/ceo.2024.00312.
32. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;Chapter 14:14.1.1-14.1.14. doi: 10.1002/0471142735.im1401s83.
33. Ralph P, Nakoinz I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* 1975;257(5525):393-394. doi: 10.1038/257393a0.
34. Zhuang L, Pound JD, Willems JJLP, et al. Pure populations of murine macrophages from cultured embryonic stem cells. *J Immunol Methods.* 2012;385(1):1-14. doi: 10.1016/j.jim.2012.07.008.
35. Manual para Elaboração de Estudos Pré-Clínicos. Universidade Nove de Julho; 2023.
36. SIQUEIRA E SILVA, R. T. Efeito de fotobiomodulação associada à dexametasona na modulação inflamatória e viabilidade de macrófagos ativados para perfil M1: estudo *in vitro*. 2024. Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2024.