

A FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE ALZHEIMER E O DESENVOLVIMENTO DE ESFEROIDES NEURONAIS

Geisa Rodrigues Salles¹, Luiza de Andrade Giralddi¹, Marimelia Aparecida Porcionatto^{2,3}, Cristina Pacheco Soares¹

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos-SP, Brasil, geisa_salles@yahoo.com.br, luandradegiralddi@gmail.com, cpsoares@univap.br

²Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, Vila Clementino, 04039-032, São Paulo-SP, marimelia.porcionatto@gmail.com

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Modelagem de Doenças Humanas Complexas com Plataformas 3D (INCT Model 3D), São Paulo, Brasil

Resumo

Na neurobiologia da doença de Alzheimer (DA), a fotobiomodulação (terapia com luz nos comprimentos de onda vermelho a infravermelho) emergiu como uma modalidade promissora, com potenciais efeitos neuroprotetores. Dentro da neurotecnologia, a produção de modelos tridimensionais (3D) tem importante destaque, minimizando o uso de animais e permitindo interações complexas de estruturas celulares. Com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico da fotobiomodulação na DA e também reproduzir os mecanismos celulares neuronais, inicialmente, irradiou-se com diodo emissor de luz (LED, vermelho 660nm) células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) diferenciadas para modelo neuronal, estressadas oxidativamente, para simular esta importante característica da DA, e avaliou-se a citoviabilidade. Paralelamente, esferoides neuronais 3D foram produzidos e caracterizados para futuros ensaios. A fotobiomodulação foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade de células neuronais, ao passo que, em relação à modelagem 3D, foram formados esferoides neuronais, os quais serão futuramente utilizados para abordagem celular e validação terapêutica da fotobiomodulação.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Fotobiomodulação. Modelagem 3D.

Área do Conhecimento: Engenharia biomédica.

Introdução

A doença de Alzheimer (DA), tipo mais comum de demência na atualidade, tem sua prevalência aumentada, dentre outros fatores, pelo aumento na expectativa de vida populacional. Em sua patogenia, sabe-se que o estresse oxidativo é um fator elementar. Por meio dele, há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de desintoxicar intermediários reativos ou reparar os danos resultantes, conseqüentemente, comprometendo o funcionamento dos neurônios e resultando em sua respectiva morte.

Recentemente, a fotobiomodulação vem ganhando destaque como ferramenta terapêutica para a DA, atenuando a neurotoxicidade (TIAN; WANG; HUANG; YU *et al.*, 2023), além de restaurar a função mitocondrial, reduzindo a neuroinflamação e estresse oxidativo (DOS SANTOS CARDOSO; MARTINS; DA SILVA, 2020), estimulando importantes processos celulares, induzindo a neurogênese e a plasticidade sináptica, fatores-chave implicados na progressão da DA (ENENGL; HAMBLIN; DUNGEL, 2020; YANG; WU; PARKER; LI *et al.*, 2022). Sendo também neuroprotetora, demonstrando a propriedade de atuar, segundo Hamblin (2019) (HAMBLIN, 2019), de diferentes modos, em células em diferentes estados fisiológicos ou patológicos.

Contudo, os complexos mecanismos celulares de atuação da fotobiomodulação na DA são ainda obscuros, uma vez que os modelos *in vitro* não são capazes de reproduzir muitos aspectos da doença. Portanto, a transição para modelos tridimensionais (3D) oferece um contexto estruturalmente mais relevante para investigar organização, interação célula-célula, célula-matriz extracelular, célula-proteínas, simulando suas propriedades estruturais, bioquímicas e conectivas (ZHUANG; SUN; AN; CHUA *et al.*, 2018) e contribuindo com a eficácia de intervenções terapêuticas, incluindo a fotobiomodulação.

No âmbito das neuropatologias degenerativas como a DA, os modelos *in vitro* 3D são capazes de criar microambientes nos quais as células podem crescer em um sistema semelhante a um tecido (MARRAZZO; ANGELONI; HRELIA, 2019). Além disso, comparado com cultura em monocamada, a tridimensionalidade pode melhor mimetizar a comunicação entre as células neurais, as quais poderão melhor desenvolver uma rede de interação com células adjacentes (ANTILL-O'BRIEN; BOURKE; O'CONNELL, 2019), facilitando a análise de como as mesmas podem ser impactadas quando expostas à condição da DA (KANG; CHO, 2021; PARK; WETZEL; MARRIOTT; DRÉAU *et al.*, 2018), em um microambiente de distribuição 3D. Pode-se também melhor acompanhar a orientação, projeção e migração celular sob diferentes condições (MARRAZZO; ANGELONI; HRELIA, 2019). Assim, parâmetros como o acúmulo e organização de β amiloide, inflamação e danos celulares podem ser avaliados em um microambiente multicelular, representando um promissor modelo, estruturando a arquitetura e funcionalidade celular e molecular da patologia (FIORE; TAMER-MAHONEY; BEHESHTI; NIELAND *et al.*, 2022; SALLES; DALL'AGNOL FERREIRA; FERREIRA; PACHECO-SOARES *et al.*, 2023; SALLES; DALL'AGNOL FERREIRA; PACHECO-SOARES; PORCIONATTO *et al.*, 2023).

Deste modo, neste trabalho, inicialmente validou-se a fotobiomodulação, com irradiação a diodo emissor de luz (LED, vermelho 660nm), em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) diferenciadas para modelo neuronal, expostas ou não ao estresse oxidativo característico da DA. Além disso, foi desenvolvido e caracterizado um modelo neuronal 3D *in vitro*, o qual será futuramente utilizado para ensaios terapêuticos e abordagens celulares da DA.

Objetivo

Avaliar o potencial da fotobiomodulação na DA, irradiando, com LED 660nm, células neuronais expostas à condição de estresse oxidativo. Paralelamente, desenvolver um modelo neuronal 3D.

Metodologia

I. Fotobiomodulação em modelo *in vitro* da DA

11. Cultura de células SH-SY5Y

A linhagem de células SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) foi cultivada no seguinte meio completo: *Dulbecco's Modified Eagle/Nutrient Mixture F12* (DMEM/F12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% Penicilina/Estreptomina. As células foram incubadas a 37 °C, atmosfera a 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias.

12. Plaqueamento e diferenciação de células SH-SY5Y

Ao atingir 80% de confluência, as células SH-SY5Y foram plaqueadas na densidade de 5x10⁵ células/mL, cultivadas por 24h com meio completo (descrito no item I1) e expostas, por 72h, ao seguinte meio de diferenciação para modelo neuronal: 10 μ M ácido retinóico, 0,5% SFB, 1% Penicilina/Estreptomina, diluídos em meio DMEM/F12.

13. Indução de estresse oxidativo

Após a diferenciação para modelo neuronal, foi induzido estresse oxidativo nas amostras por exposição à 200 μ M H₂O₂, por 1h.

14. Irradiação a LED

Após a diferenciação em modelo neuronal e indução de estresse oxidativo, as células foram irradiadas em um equipamento de irradiação (IrradLed, Biopdi), no comprimento de onda 660nm, fluência de 3 J/cm², densidade de energia de 36,8 mW/cm² e consequente tempo de irradiação de 82 segundos. As amostras foram avaliadas 2h após a irradiação.

15. Viabilidade e Morfologia celulares

No ensaio de viabilidade, logo após a irradiação, o meio de cultura das células foi substituído por solução de Resazurina (Sigma-Aldrich) a 10% diluída em meio DMEM/F12. As amostras foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂, por 2h. Posteriormente, leu-se a fluorescência da solução (excitação em

544nm e emissão em 640nm). Como controle negativo, a solução de Resazurina livre de células foi incubada nas mesmas condições.

Duas horas após a irradiação, foram também capturadas imagens em microscopia de campo claro das amostras, a fim de observar seu arranjo morfológico.

II. Modelagem 3D neuronal

II 1. Produção dos moldes para cultura 3D

Para preparar placa revestida com agarose a 2% (m/v), o pó purificado de agarose foi dissolvido em tampão fosfato salina (PBS) e autoclavado. Cinco mL da solução foram adicionados a cada poço de uma placa de 6 poços, sobre os quais foi depositado o carimbo molde para formação dos esferoides. Após gelificação à temperatura ambiente, removeu-se o carimbo, adicionou-se PBS aos poços e as placas foram armazenadas a 4 °C até semeadura das células sobre os mesmos.

II2. Cultura 3D neuronal

Na densidade de 5×10^5 células/mL, células SH-SY5Y foram semeadas sobre os moldes. Cultivou-se em meio completo (conforme descrição no item I1), por 48h, e, posteriormente, em meio de diferenciação para modelo neuronal (conforme descrição no item I2), por 48h. Em seguida, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% (diluído em PBS).

II3. Morfologia celular

A fim de visualizar a morfologia das culturas 3D, foram capturadas imagens em microscopia de campo claro das amostras, nos dias 0 (logo após plaqueamento nos poços 3D) e 4.

Além disso, também no dia 4, as amostras fixadas foram desidratadas, passando por uma série de concentrações crescentes de etanol (30 a 95%), por 5 minutos cada, seguidas por etanol 95% + hexametildisilazano (HMDS) (1:1) por 5 minutos e HMDS puro por 5 minutos. Após a secagem, o material foi metalizado e analisado no microscópio eletrônico de varredura EVO-Zeiss®.

II4. Marcação citoesqueleto e núcleo

A fim de observar a distribuição dos neuritos nas culturas 3D, após fixados, os esferoides foram permeabilizados, por 15 min, com Triton X-100 0,1% (diluído em PBS) e, então, incubados com 100 µg/mL de rodamina-faloidina (Invitrogen TM, 1810954) e 0,5 µg/mL de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), overnight, a 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS e analisadas no microscópio confocal (Zeiss Axiovert 100M, Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha).

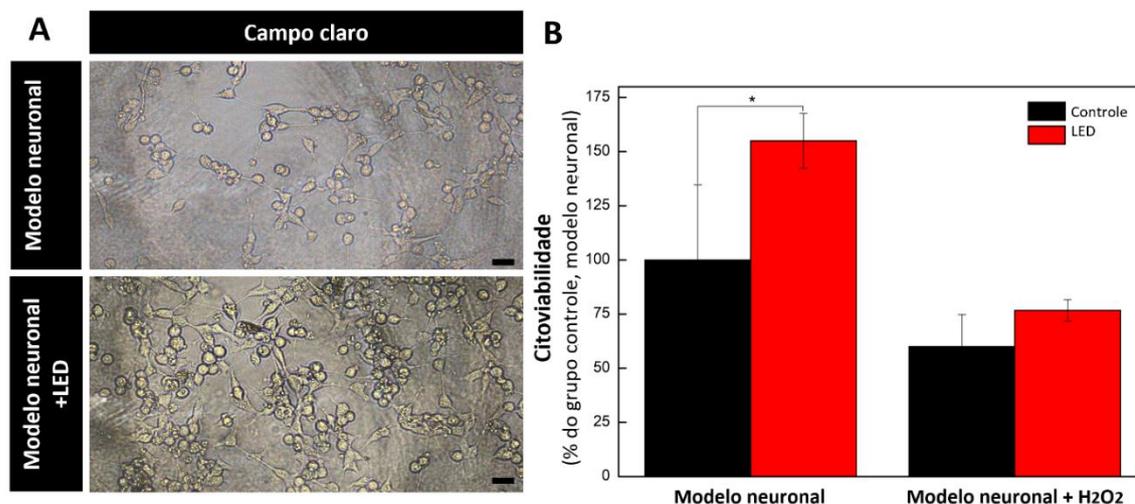
Resultados

Neste trabalho, inicialmente, avaliou-se o potencial da fotobiomodulação em células neuronais e também modelo da DA. Para isto, células SH-SY5Y foram diferenciadas em modelo neuronal e expostas ou não a 200µM H₂O₂, por 1h, para simular o estresse oxidativo característico da DA. Os grupos foram expostos à irradiação a LED (660nm, 3J/cm², 82 seg de irradiação) e, após 2h, foram capturadas imagens em microscopia de campo claro e avaliou-se a citoviabilidade dos grupos.

Como apresentado na **Fig.1 A**, visualmente há muito mais células no grupo exposto ao LED do que no grupo controle (modelo neuronal). A **Fig. 1 B** demonstra que, após exposição ao LED, as células neuronais estatisticamente têm sua viabilidade aumentada ($p < 0,05$, em relação ao grupo controle), ao passo que, embora entre os grupos expostos ao H₂O₂ não tenha havido diferença estatística, há uma tendência ao aumento da viabilidade após exposição ao LED também.

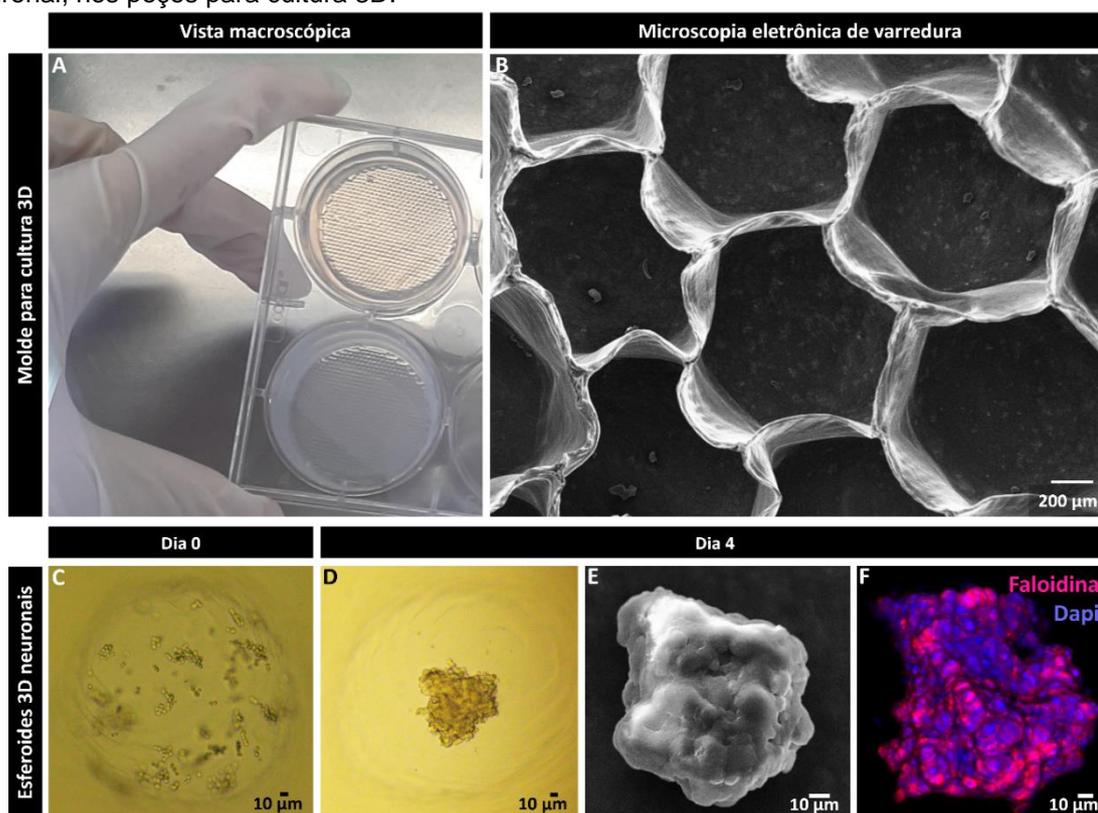
A segunda etapa do trabalho consistiu em desenvolver um modelo 3D capaz de reproduzir as propriedades neuronais. Deste modo, como demonstrado na **Fig. 2 A-B**, foram produzidos moldes de agarose em placas de 6 poços, com diâmetro médio de 1mm em cada berço do molde. A **Fig. 2 C** apresenta uma micrografia de campo claro das células SH-SY5Y 1h após serem plaqueadas sobre os moldes. A **Fig. 2 D** mostra um esferoide neuronal 3D 4 dias após plaqueamento das células sobre os moldes (sendo as mesmas cultivadas por 2 dias em meio completo, seguido de 2 dias em meio de diferenciação neuronal). Na **Fig. 2 E**, observa-se, por microscopia eletrônica de varredura, a morfologia 3D superficial do esferoide e a **Fig. 2 F** apresenta a distribuição de citoesqueleto e núcleos das células neuronais, em *z-stack*.

Figura 1: Fotobiomodulação em células modelo neuronal e modelo da DA. **(A)** Micrografias de campo claro das células SH-SY5Y diferenciadas para modelo neuronal, 2h após exposição ou não à irradiação a LED (660nm, 3J/cm²). Barras de escala representam 10 μm. **(B)** Citoviabilidade das células do modelo neuronal e modelo da DA (modelo neuronal com exposição a 200 μM H₂O₂, por 1h), 2h após irradiação ou não com LED (660nm, 3J/cm²). (*p<0,05, em comparação ao grupo controle das células neuronais).



Fonte: Autores.

Figura 2: Cultura 3D neuronal, caracterização e validação do modelo. **(A)** Vista macroscópica e **(B)** Micrografia eletrônica de varredura da microplaca com molde para cultura 3D. **(C-D)** Micrografia de campo claro, **(E)** Micrografia eletrônica de varredura e **(F)** Z-stack da marcação de citoesqueleto (Faloidina, magenta) e núcleo (Dapi, azul) de cultura 3D de SH-SY5Y diferenciadas para modelo neuronal, nos poços para cultura 3D.



Fonte: Autores.

Discussão

Neste trabalho, duas importantes pautas da neurobiologia foram abordadas: (i) a fotobiomodulação na DA e (ii) a modelagem 3D neuronal.

À respeito da fotobiomodulação na DA, diversas evidências sugerem que a luz, nos comprimentos de onda do infravermelho ao vermelho, pode ser utilizada para neuroproteção, essencialmente, promovendo sua sobrevivência e longevidade, revertendo processos de sinalização apoptótica, melhorando sinaptogênese, neurogênese, reduzindo estresse oxidativo (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016), aumentando influxo sanguíneo (HAMBLIN, 2019) e protegendo contra senescência (LING; MENG; CHEN; XING, 2014).

Na **Fig. 1**, demonstra-se que, quando diferenciadas para modelo neuronal, a quantidade e a viabilidade das células aumentam estatisticamente quando expostas ao LED 660nm. Embora não haja diferença estatística, há uma tendência do mesmo comportamento nos grupos expostos H_2O_2 , indicando que, muito possivelmente, há aumento da viabilidade nas células sob estresse oxidativo induzido, quando expostas à irradiação a LED 660nm, corroborando ensaios realizados em animais modelos da DA (HUANG; HAMBLIN; ZHANG; THERAPY, 2024).

A fotobiomodulação é responsável por regular as funções mitocondriais (HAMBLIN; PHOTOBIOLOGY, 2018), o que está grandemente impactado na DA (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016) em consequência do estresse oxidativo. Espera-se, portanto, explorar com maior profundidade o potencial neurobiológico da irradiação a LED 660nm, a fim de compreender seus mecanismos celulares.

Para melhor representar *in vitro* a organização neuronal, neste trabalho desenvolveu-se também um modelo 3D esferoide neuronal (**Fig. 2**), a fim de que o mesmo possa melhor representar a distribuição celular em um tecido (MARRAZZO; ANGELONI; HRELIA, 2019). Além disso, comparado com cultura em monocamada, a tridimensionalidade pode melhor mimetizar a comunicação entre as células neuronais, as quais poderão melhor desenvolver uma rede de interação com células adjacentes (ANTILL-O'BRIEN; BOURKE; O'CONNELL, 2019), facilitando a análise de como as mesmas podem ser impactadas quando expostas a estresse oxidativo e outras condições da DA (KANG; CHO, 2021; PARK; WETZEL; MARRIOTT; DRÉAU *et al.*, 2018). Pode-se também melhor acompanhar a orientação, projeção e migração celular sob diferentes condições (MARRAZZO; ANGELONI; HRELIA, 2019) (FIORE; TAMER-MAHONEY; BEHESHTI; NIELAND *et al.*, 2022; SALLES; DALL'AGNOL FERREIRA; FERREIRA; PACHECO-SOARES *et al.*, 2023; SALLES; DALL'AGNOL FERREIRA; PACHECO-SOARES; PORCIONATTO *et al.*, 2023).

Os esferoides produzidos neste trabalho, após 4 dias de cultura, possuem conformação 3D (**Fig. 2 D-E**), além de distribuição homogênea citoplasmática e nuclear ao longo de toda sua estrutura (**Fig. 2 F**). Nossos próximos ensaios incluem aprimorar o modelo 3D neuronal para que seja capaz de simular aspectos patogênicos da DA, bem como avaliar os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação nestes modelos 3D.

Conclusão

Neste trabalho, demonstrou-se o potencial proliferativo e de aumento da citoviabilidade da fotobiomodulação a LED (660nm) em células neuronais, expostas ou não ao H_2O_2 , o qual representa o estresse oxidativo característico da DA. Foi também desenvolvido um modelo neuronal esferoide 3D, o qual será utilizado para futuros ensaios terapêuticos e de abordagem para a DA.

Referências

ANTILL-O'BRIEN, N.; BOURKE, J.; O'CONNELL, C. D. J. M. Layer-by-layer: The case for 3D bioprinting neurons to create patient-specific epilepsy models. 12, n. 19, p. 3218, 2019.

DOS SANTOS CARDOSO, F.; MARTINS, R. Á. B. L.; DA SILVA, S. G. J. J. o. L. i. M. S. Therapeutic potential of photobiomodulation in Alzheimer's disease: a systematic review. 11, n. Suppl 1, p. S16, 2020.

ENENGL, J.; HAMBLIN, M. R.; DUNGEL, P. J. J. o. A. s. D. Photobiomodulation for Alzheimer's disease: translating basic research to clinical application. 75, n. 4, p. 1073-1082, 2020.

FIORE, N. J.; TAMER-MAHONEY, J. D.; BEHESHTI, A.; NIELAND, T. J. *et al.* 3D biocomposite culture enhances differentiation of dopamine-like neurons from SH-SY5Y cells: A model for studying Parkinson's disease phenotypes. 290, p. 121858, 2022.

HAMBLIN, M. R., 2019, **Photobiomodulation for Alzheimer's disease: has the light dawned?** MDPI. 77.

HAMBLIN, M. R. J. P.; PHOTOBIOLOGY. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. 94, n. 2, p. 199-212, 2018.

HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. J. B. r. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. 4, n. 5, p. 519-522, 2016.

HUANG, Z.; HAMBLIN, M. R.; ZHANG, Q. J. A. s. R.; THERAPY. Photobiomodulation in experimental models of Alzheimer's disease: state-of-the-art and translational perspectives. 16, n. 1, p. 114, 2024.

KANG, Y. J.; CHO, H. J. O. Human brain organoids in Alzheimer's disease. 1, 2021.

LING, Q.; MENG, C.; CHEN, Q.; XING, D. J. J. o. c. p. Activated ERK/FOXO1 pathway by low-power laser irradiation inhibits UVB-induced senescence through down-regulating p21 expression. 229, n. 1, p. 108-116, 2014.

MARRAZZO, P.; ANGELONI, C.; HRELIA, S. Combined treatment with three natural antioxidants enhances neuroprotection in a SH-SY5Y 3D culture model. *Antioxidants (Basel)* 8 (10): Pii: E420. 2019.

PARK, J.; WETZEL, I.; MARRIOTT, I.; DRÉAU, D. *et al.* A 3D human triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. 21, n. 7, p. 941-951, 2018.

SALLES, G. R.; DALL'AGNOL FERREIRA, N.; FERREIRA, C. P.; PACHECO-SOARES, C. *et al.* 3D Bioprinted differentiated murine neurospheres as a neurogenesis model. 19, p. e078512, 2023.

SALLES, G. R.; DALL'AGNOL FERREIRA, N.; PACHECO-SOARES, C.; PORCIONATTO, M. A. J. A. s. *et al.* 3D bioprinted human neuron-like spheroids as an in vitro model for neurodegenerative diseases. 19, p. e075956, 2023.

TIAN, Z.; WANG, P.; HUANG, K.; YU, J. *et al.* Photobiomodulation for Alzheimer's disease: photoelectric coupling effect on attenuating A β neurotoxicity. 38, n. 1, p. 39, 2023.

YANG, L.; WU, C.; PARKER, E.; LI, Y. *et al.* Non-invasive photobiomodulation treatment in an Alzheimer Disease-like transgenic rat model. 12, n. 5, p. 2205, 2022.

ZHUANG, P.; SUN, A. X.; AN, J.; CHUA, C. K. *et al.* 3D neural tissue models: From spheroids to bioprinting. 154, p. 113-133, 2018.

Agradecimentos

Os autores agradecem à técnica Me. Priscila M. S. C. M. Leite, pela captura de imagens de microscopia eletrônica de varredura; ao laboratório da Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino, pela disponibilidade do equipamento de irradiação; à mestranda Mariela Inês Batista Dos Santos, pelo suporte com os carimbos para desenvolvimento dos moldes para cultura 3D.

Os autores também agradecem o apoio fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 152384/2024-3, GRS, e bolsa PIBIC, LAG) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo SAGe 2022/08664-4, GRS).