

UMA LUZ PARA A NEUROBIOLOGIA: A FOTOBIMODULAÇÃO A LED EM UM MODELO 3D DA DOENÇA DE ALZHEIMER

***Luiza de Andrade Giralddi, *Geisa Rodrigues Salles, Cristina Pacheco Soares.**

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

* As autoras compartilham a primeira autoria.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa progressiva associada ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, sem terapias capazes de impedir sua progressão. Nesse cenário, a fotobiomodulação (FBM) com LED vermelho (660 nm) surge como alternativa promissora por modular o metabolismo celular e atenuar danos oxidativos. Este estudo desenvolveu um modelo tridimensional (3D) *in vitro* da DA com esferoides SH-SY5Y cultivados em micropoços de agarose, diferenciados em fenótipo neuronal e submetidos a 200 μM de H_2O_2 por 1 h. O estresse oxidativo resultou em desorganização neurítica, redução da viabilidade e aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). A aplicação da FBM (3 J/cm^2) após o dano reverteu parcialmente esses efeitos, reduzindo significativamente as EROs, elevando a viabilidade celular e sugerindo restauração morfológica. O modelo 3D mostrou-se representativo da fisiopatologia da DA, servindo como plataforma relevante para o estudo da FBM como estratégia adjuvante, não invasiva e de baixo custo para mitigação de danos neuronais em doenças neurodegenerativas.

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

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência, responsável por 60–70% dos casos reportados globalmente, e estima-se que o número de indivíduos acometidos alcance cerca de 139 milhões até 2050 (“Dementia”, [s.d.]; “World Alzheimer Report 2023 Reducing dementia risk: never too early, never too late”, [s.d.]). Trata-se de uma enfermidade de elevado impacto socioeconômico e para a qual não existem terapias capazes de interromper ou reverter sua progressão. As intervenções disponíveis são predominantemente sintomáticas e frequentemente associadas a efeitos adversos (Hoffman; Bloemer, 2021), o que impulsiona a busca por alternativas inovadoras e seguras.

Entre as estratégias emergentes, a fotobiomodulação (FBM) com luz vermelha ou infravermelha (600–1100 nm) tem se destacado como abordagem não invasiva, de baixo custo e com mínima incidência de efeitos colaterais (Hamblin; Huang; Heiskanen, 2019). Evidências indicam que a FBM pode reduzir o estresse oxidativo e a neuroinflamação, restaurar a função mitocondrial (Cardoso; Lopes Martins; Da Silva, 2020) e favorecer processos de neurogênese e sinaptogênese (Salehpour et al., 2018), todos altamente relevantes diante do papel central do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da disfunção mitocondrial na fisiopatologia da DA (Dumont; Beal, 2011).

Para investigar esses efeitos, modelos *in vitro* adequados são essenciais. Culturas tridimensionais (3D), como esferoides celulares, reproduzem melhor as interações célula-célula e célula-matriz extracelular do tecido cerebral quando comparadas às culturas bidimensionais (Zhuang et al., 2018; Cenini et al., 2021). O modelo 3D de esferoides neuronais utilizado neste estudo foi previamente desenvolvido e validado, apresentando características morfológicas e funcionais compatíveis com a DA (Salles et al., 2025). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos neurorrestauradores da FBM (660 nm) sobre esferoides SH-SY5Y diferenciados e submetidos a estresse oxidativo, visando contribuir para o desenvolvimento de terapias complementares seguras e eficazes no manejo da DA.

Metodologia

Células da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera a 5% de CO₂, durante 5 dias em micropoços de agarose não aderente, na densidade de 1×10^5 células/poço (placas de 12 poços), com meio completo de Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient mixture F12 (DMEM/F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Após esse período, as células foram cultivadas por mais 5 dias em meio de diferenciação para fenótipo neuronal de DMEM/F12 suplementado com 0,5% de soro fetal bovino, 10 µM de ácido retinóico e 1% de penicilina/estreptomicina. Tanto o meio completo quanto o de diferenciação foram trocados a cada 2–3 dias.

No 10º dia de cultivo, os esferoides foram submetidos à indução de estresse oxidativo por incubação com 200 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 h. Em seguida, foram irradiados com diodo emissor de luz (LED) vermelho (660 nm, fluência de 3 J/cm², densidade de potência de 36,8 mW/cm²) por 82 segundos. As análises foram realizadas 2 h após a irradiação.

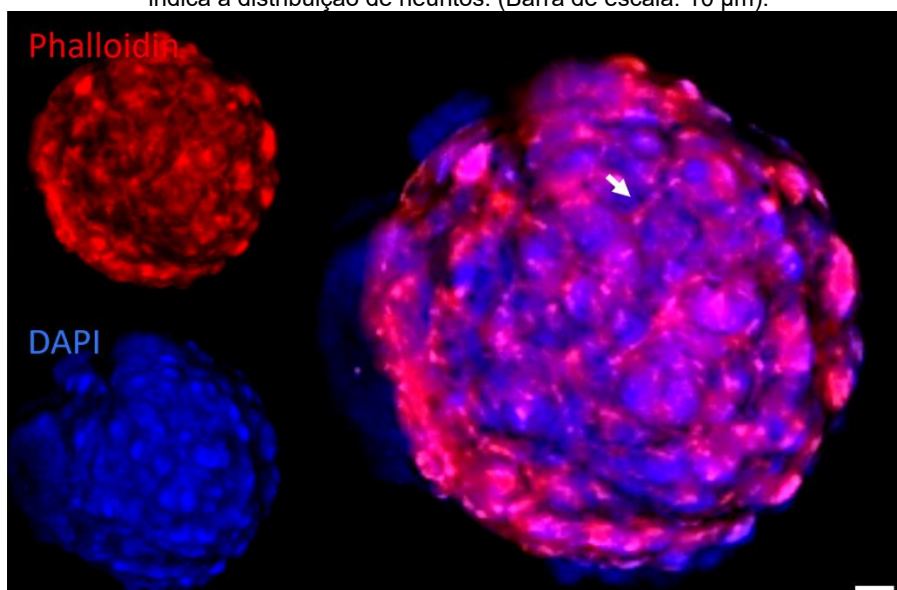
A avaliação incluiu a viabilidade celular pelo ensaio de resazurina (10% em meio de diferenciação, incubação de 2 h, leitura de fluorescência a 544 nm/590 nm), a quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo kit CellROX Orange (5 µM, 30–45 min de incubação, leitura por microscopia confocal) e a análise morfológica dos neuritos por marcação com faloidina (1:500) e do material nuclear por DAPI, também em microscopia confocal.

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo a significância estatística determinada por ANOVA unidirecional seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). A significância estatística foi estabelecida como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Resultados

Após 10 dias de cultivo, os esferoides apresentaram morfologia compacta e esférica, com superfície definida e rede neurítica radial organizada ao redor da estrutura (Figura 1). As projeções neuronais, evidenciadas por faloidina, formavam conexões intercelulares e mantinham orientação coesa, características indicativas de maturação neuronal no modelo.

Figura 1 - Z stack de esferoides diferenciados em modelo neuronal corados com faloidina/DAPI. Seta branca indica a distribuição de neuritos. (Barra de escala: 10 µm).



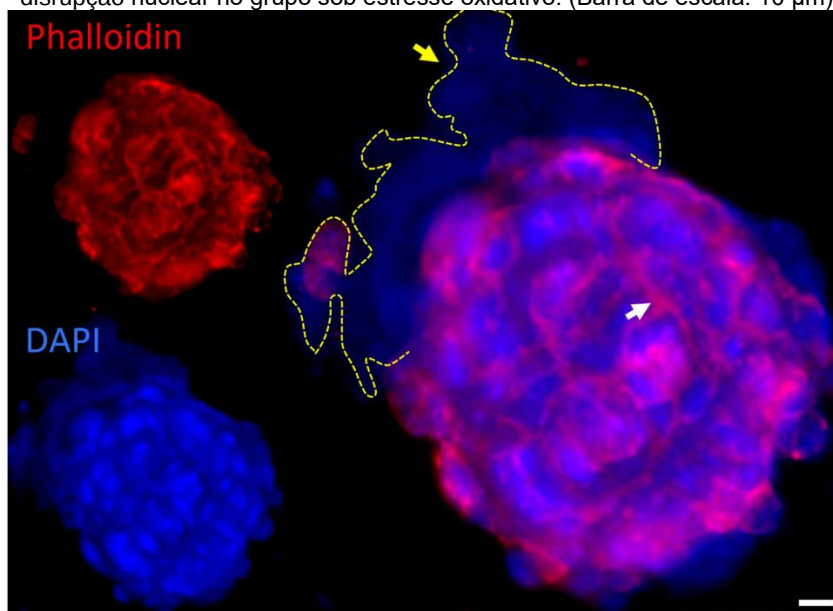
Fonte: Autores, 2025.

A exposição a H₂O₂ por 1 h resultou em alterações nucleares evidentes, incluindo coloração irregular, ruptura do envelope nuclear e reorganização atípica das células periféricas, além de perda da coesão estrutural (Figura 2). Essas mudanças estruturais foram acompanhadas por queda

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

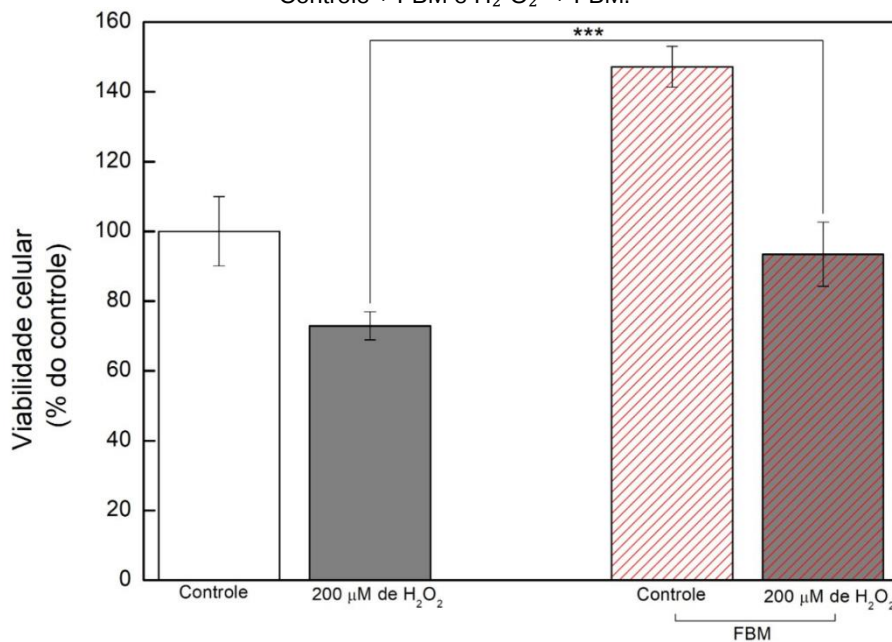
acentuada na viabilidade celular em comparação ao controle ($p < 0,001$) (Figura 3). A aplicação da FBM imediatamente após o estresse oxidativo promoveu aumento significativo da viabilidade em relação ao grupo H_2O_2 ($p < 0,05$), sugerindo recuperação parcial do metabolismo celular.

Figura 2 - Z stack de esferoides diferenciados em modelo neuronal expostos a 200 μM de H_2O_2 e corados com faloidina/DAPI. Seta branca indica a distribuição de neuritos, seta e área delimitadas em amarelo indicam a disrupção nuclear no grupo sob estresse oxidativo. (Barra de escala: 10 μm)



Fonte: Autores, 2025.

Figura 3 - Representação gráfica da viabilidade celular (ensaio de resazurina) nos grupos Controle, H_2O_2 , Controle + FBM e H_2O_2 + FBM.



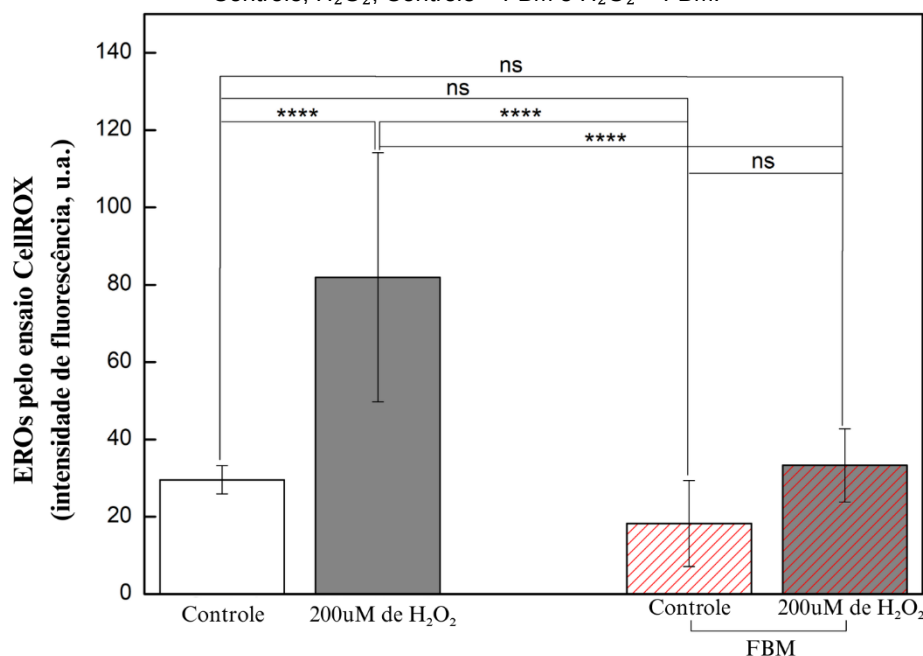
Fonte: Autores, 2025.

A indução do estresse oxidativo também elevou significativamente os níveis de EROs ($p < 0,0001$) em relação ao controle, evidenciado por aumento da fluorescência do CellROX Orange (Figura 4). A

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

aplicação da FBM reduziu de forma expressiva os níveis de EROs em relação ao grupo H_2O_2 ($p < 0,0001$), aproximando-os dos valores basais, o que indica modulação positiva do estado redox celular.

Figura 4 - Representação gráfica da quantificação de EROs intracelulares pelo CellROX Orange nos grupos Controle, H_2O_2 , Controle + FBM e H_2O_2 + FBM.



Fonte: Autores, 2025.

Discussão

Os resultados demonstram que o modelo 3D de esferoides neuronais reproduz características relevantes da fisiopatologia da DA, incluindo suscetibilidade ao estresse oxidativo e alterações estruturais da rede neurítica, conforme descrito em outros estudos com modelos celulares e animais (Cenini et al., 2021; Jack et al., 2018). A redução da viabilidade e o aumento dos níveis de EROs após a exposição a H_2O_2 confirmam a eficácia do protocolo de indução de dano oxidativo, o qual mimetiza um dos mecanismos centrais envolvidos na neurodegeneração da DA (Cheignon et al., 2018a).

A aplicação de FBM após o dano oxidativo levou a uma diminuição significativa dos níveis de EROs, sugerindo efeito antioxidante e potencial neurorrestaurador. Esse achado está alinhado com relatos de que a FBM, em comprimentos de onda do vermelho e infravermelho próximo, modula a atividade mitocondrial e reduz a produção de radicais livres, favorecendo a recuperação celular (Hamblin, 2016). Em modelos neuronais, esses efeitos têm sido atribuídos à ativação da citocromo c oxidase, melhora da bioenergética celular e modulação de vias de sinalização associadas à sobrevivência celular (Hamblin, 2016; Wong-Riley et al., 2005).

A adoção de um modelo 3D confere vantagens em relação a culturas bidimensionais (2D), pois promove interações célula-célula e célula-matriz extracelular mais próximas do ambiente *in vivo*, além de permitir o estabelecimento de gradientes de oxigênio e nutrientes que influenciam o comportamento celular (Fennema et al., 2013; Zhuang et al., 2018). No contexto da DA, esses modelos facilitam o estudo de processos como acúmulo de A β , neuroinflamação e disfunção mitocondrial de forma mais fisiologicamente relevante (Cenini et al., 2021).

Conclusão

O modelo 3D desenvolvido com esferoides neuronais da linhagem SH-SY5Y reproduziu de forma consistente aspectos-chave da fisiopatologia da DA, incluindo vulnerabilidade ao estresse oxidativo e alterações estruturais da rede neurítica. A aplicação de FBM com LED vermelho após a indução do dano oxidativo reduziu significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio e indicou melhora

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

na organização neuronal, sugerindo potencial neurorestaurador. Esses achados reforçam a utilidade do modelo 3D como plataforma experimental para estudos de neurodegeneração e sustentam a FBM como abordagem terapêutica promissora a ser explorada em investigações futuras.

Referências

CARDOSO, F. D. S.; LOPES MARTINS, R. A. B.; DA SILVA, M. D. Photobiomodulation therapy: mechanisms of action and clinical applications in neurological disorders. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, v. 38, n. 6, p. 327-336, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/photob.2020.4877>. Acesso em: 13 ago. 2025.

CENINI, G.; DELL'AGNELLO, C.; SQUILLARO, T. Advanced 3D cell culture models for Alzheimer's disease: from development to therapeutic testing. *Cells*, v. 10, n. 9, p. 2257, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10092257>. Acesso em: 13 ago. 2025.

CHEIGNON, C. *et al.* Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, v. 14, p. 450-464, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>. Acesso em: 13 ago. 2025.

DEMENTIA. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em: 13 ago. 2025.

DUMONT, M.; BEAL, M. F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, n. 5, p. 1014-1026, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026>. Acesso em: 13 ago. 2025.

FENNEMA, E. *et al.* Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 108-115, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>. Acesso em: 13 ago. 2025.

HAMBLIN, M. R. Shining light on the head: photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clinical*, v. 6, p. 113-124, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.09.002>. Acesso em: 13 ago. 2025.

HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y. Y.; HEISKANEN, V. Photobiomodulation in neurodegenerative diseases: a review of mechanisms of action and therapeutic potential. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 190, p. 111330, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111330>. Acesso em: 13 ago. 2025.

HOFFMAN, J. R.; BLOEMER, J. Current and emerging treatments for Alzheimer's disease: a review. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, v. 5, p. 413-427, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/ADR-210294>. Acesso em: 13 ago. 2025.

JACK, C. R. *et al.* NIA-AA Research Framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, v. 14, n. 4, p. 535-562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>. Acesso em: 13 ago. 2025.

SALLES, G. R. *et al.* 2D and 3D models of Alzheimer's disease: investigating neuron-like cells in oxidative environments. *ACS Omega*, v. 10, n. 25, p. 27501-27514, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c03306>. Acesso em: 13 ago. 2025.

SALEHPOUR, F. *et al.* Transcranial photobiomodulation therapy: a review of neurocognitive benefits. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, v. 36, n. 10, p. 517-529, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/photob.2018.4474>. Acesso em: 13 ago. 2025.

A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO**

WONG-RILEY, M. T. T. *et al.* Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 6, p. 4761-4771, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409650200>. Acesso em: 13 ago. 2025.

WORLD ALZHEIMER REPORT 2023 REDUCING DEMENTIA RISK: NEVER TOO EARLY, NEVER TOO LATE. Alzheimer's Disease International. Disponível em: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2023/>. Acesso em: 13 ago. 2025.

ZHUANG, P. *et al.* Three-dimensional culture of neural stem cells in collagen-hyaluronic acid scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 179, p. 91-102, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.017>. Acesso em: 13 ago. 2025.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 152384/2024-3 (GRS), e do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), processos nº 147392/2024-9 e 157999/2025-4 (LAG), além do suporte institucional da Universidade do Vale do Paraíba (Univap). Agradecemos, ainda, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo, com menção especial aos professores Dr. Leandro José Raniero e Dra. Juliana Ferreira-Strixino, bem como às suas equipes, pela disponibilização dos equipamentos que viabilizaram a conclusão desta pesquisa.