

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

STEPHANIE OLIVEIRA DE ARAÚJO

**EFEITO MODULADOR DA LASER TERAPIA SISTÊMICA NA
INFLAMAÇÃO EM MODELO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

VITÓRIA

2024

STEPHANIE OLIVEIRA DE ARAUJO

**EFEITO MODULADOR DA LASER TERAPIA SISTÊMICA NA
INFLAMAÇÃO EM MODELO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Diego França Pedrosa

VITÓRIA/ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48e Oliveira de Araújo, Stephanie, 1993-
Efeito modulador da laserterapia sistêmica na inflamação em modelo de acidente vascular encefálico / Stephanie Oliveira de Araújo. - 2024.
92 p. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Coorientador: Diego França Pedrosa.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Acidente vascular cerebral. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. Saúde. 5. Fotobioestimulação. I. Valentim Nogueira, Breno. II. França Pedrosa, Diego. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 233ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **Stephanie Oliveira de Araujo**, realizada às nove horas do dia dezoito de outubro de dois mil e vinte e quatro. A sessão pública foi realizada no auditório do PPGBiotec, com transmissão por videoconferência por meio do link <https://meet.google.com/pvz-ihmq-zyw>. O presidente da Banca, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Diego França Pedrosa, coorientador; Teodiano Freire Bastos Filho, examinador interno; André Romero, examinador externo. Em seguida, passou a palavra à aluna que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“Efeito Modulador da Inflamação da Laserterapia Sistêmica em modelo de Acidente Vascular Encefálico”**. Terminada a apresentação, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, o presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA** e que a aluna deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final do trabalho. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 18 de outubro de 2024.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Prof. Dr. Diego França Pedrosa
Universidade Federal do Espírito Santo – Coorientador

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho
Universidade Federal do Espírito Santo - Examinador interno

André Romero
Instituto Federal do Espírito Santo - Examinador externo



BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 18/10/2024 às 11:33

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://apilepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1013738?tipoArquivo=O>



DIEGO FRANCA PEDROSA - SIAPE 1773009
Departamento de Educação Integrada em Saúde - DEIS/CCS Em
18/10/2024 às 11:35

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://apilepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1013742?tipoArquivo=O>



TEODIANO FREIRE BASTOS FILHO - SIAPE 1231541
Departamento de Engenharia Elétrica - DEE/CT
Em 18/10/2024 às 12:24

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://apilepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1013793?tipoArquivo=O>

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
FOLHA DE ASSINATURAS
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS

**ATA DE DEFESA N° Ata - Defesa - Stephanie/2024 - UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO
SANTO (ES - FEDERAL)**

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 18/10/2024 23:18)

ANDRE ROMERO DA SILVA
PRO-REITOR(A) - TITULAR
REI-PRPPG (11.02.37.15)
Matrícula: 1653769

Visualize o documento original em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: **Ata - Defesa - Stephanie**, ano: **2024**, tipo: **ATA DE DEFESA**, data de emissão: **18/10/2024** e o código de verificação: **ef1e7085e0**

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu amado esposo, Stefano Gomes de Jesus. Sua ajuda incansável, apoio constante e força inabalável foram fundamentais para que eu pudesse concluir este percurso. Você esteve ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e permitindo que eu chegasse até o fim.

Aos meus queridos filhos, Alice Oliveira Barcelos e Miguel Oliveira Gomes, dedico esta conquista. Vocês são minha inspiração diária e minha maior motivação para seguir em frente. A presença de vocês em minha vida dá sentido a cada esforço.

À minha mãe, que sempre foi um incentivo e um espelho para mim, como uma mulher guerreira e batalhadora, expresso minha profunda gratidão. Seu exemplo de determinação e coragem me guiou durante toda esta jornada.

A todos vocês, minha eterna gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus, por me sustentar, me capacitar e me dar condições para chegar até aqui. Sua presença foi real e fundamental em cada passo desta jornada. Só Ele sabe o quanto muitas vezes me faltaram forças para suportar o processo pessoal que vivi em concomitância com a realização do mestrado, mas posso dizer e gostaria de gritar em alta voz: “EBENÉZER, até aqui me ajudou o Senhor”. Como diz uma canção que gosto: “Sobrevivi, fiquei mais forte, aprendi, machucou, mais estou de pé, a dor não foi maior que minha fé”.

Agradeço ao meu amado esposo, Stefano Gomes de Jesus, por todas as idas e vindas em que ele me apoiou, sempre ao meu lado, “sem deixar a peteca cair”, mesmo com as dificuldades com a casa, as crianças e nossa distância geográfica de Vitória, com muita paciência e amor, ele dizia: “começou, agora termina; estou aqui com você”. Seu apoio incondicional foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Assim como também sou grata a toda a minha família que foi minha base: minha mãe sempre forte comigo deixando claro o quanto acredita em mim, minhas irmãs me dando apoio e consolo, minha sogra e suas orações, e todos que não consigo citar aqui.

Deus me deu uma segunda família chamada Igreja Comunidade Bethel, meus pastores, minha liderança e amigos foram uma rede de apoio que me fortaleceu neste processo também. Agradeço cada mensagem de incentivo, cada oração. Vocês não desistiram de mim mesmo quando precisava estar ausente. Obrigada por serem um presente de Deus na minha vida.

Ao meu professor, Breno Valentim Nogueira, sou imensamente grata por ser um exemplo para mim. Agradeço por seu constante apoio, por ser sempre solícito e por me ensinar tanto, não apenas sobre a ciência, mas também sobre a vida. Obrigada por compreender minhas demandas, e foram muitas (amamentação, problemas de saúde, morar no interior, etc). Agradeço por não desistir de mim, pelo contrário, por acreditar que eu conseguiria finalizar este trabalho.

Meu sincero agradecimento ao professor Diego França Pedrosa, por seu árduo trabalho ao me ensinar as técnicas de cirurgia e por ser um pouco psicólogo, sempre disposto a me ouvir.

Agradeço a cada colega de trabalho do laboratório. Em especial, agradeço ao Ezio: você se dedicou tanto a me apoiar, mesmo em meio a tantas demandas dos seus projetos. Alessandra, minha amiga/meio mãe por orar, me dar forças e me ajudar sempre que pôde. Meu amigo que virou um irmão pra mim, Wedson, obrigada pelo apoio que foi desde a bancada, até a estatística, escrita, e tanta dedicação que não caberia aqui. Nossa Susu e a todos os ICs que contribuíram para o meu trabalho: Luís, Marcos, Gabriela e Gabriel, vocês foram competentes e imprescindíveis para os meus experimentos serem realizados. Não posso esquecer do meu amigo mais internacional, Marcos Leal, que, mesmo de longe, sempre foi muito solícito a me ajudar. Aproveito para expressar minha gratidão a Tadeus e Flavinho, sempre super abertos a passar o conhecimento e me apoiar.

Gratidão ao Prof. Thiago que me permitiu a intermediação para que eu conseguisse realizar as medidas sanguíneas, me ajudou tanto, e também a Marcela Porto que realizou os protocolos de CBA.

Agradeço os laboratórios multiusuários LABIOM e LUCCAR. Sou grata ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de ter passado por todo este aprendizado e por ter profissionais tão humanizados e competentes. Aproveito para agradecer também a Prof.^a Adriana Madeira, pela imensa parceria: me abraçou, consolou diversas vezes, foi uma peça chave para esta conquista também.

Gostaria também de expressar minha gratidão à FAPES, pelo financiamento e apoio com a bolsa de estudos, que tornou possível a realização desta pesquisa.

A todos vocês, meu mais sincero obrigada, estarão sempre em meu coração, como uma família: Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NBT) e Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR).

EPÍGRAFE

"Seja forte, corajoso, não temas e não desanime. Eu sou teu Deus e cuido de ti. Vai ser sempre assim."

— Isadora Pompeo, 2017

RESUMO

ARAÚJO, S.O. **Efeito modulador da laser terapia sistêmica na inflamação em modelo de acidente vascular encefálico**. 2024. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo, Brasil. Esta dissertação de mestrado analisou os impactos da fotobiomodulação sistêmica, por meio da técnica não invasiva de Irradiação Intravascular do Sangue por Laser, do inglês, Intravascular Laser Irradiation of Blood - ILIB, em modelo experimental de isquemia cerebral global em camundongos. O foco principal foi examinar como essa terapia atua de forma dose-dependente na recuperação de lesões cerebrais causadas por oclusão bicarotídea. Os camundongos foram expostos a essa oclusão, após a qual foi realizada a aplicação do ILIB na dose de 3,2 J (grupo TL) e 6 J (grupo TH), e os efeitos terapêuticos foram medidos através de parâmetros funcionais e bioquímicos. As avaliações motoras dos camundongos foram realizadas em dois momentos distintos: antes e depois da indução do Acidente Vascular Encefálico (AVE), mostrando uma melhora expressiva nos grupos tratados com ILIB, especialmente nas doses mais altas, aprimorando a habilidade motora, a força e a mobilidade dos camundongos, bem como uma diminuição do tempo de inatividade. Foi realizada análise da área macroscópica de infarto cerebral, e o grupo tratado apresentou uma redução ($p < 0,01$), da área lesionada pela isquemia. Além disso, foram coletadas amostras de sangue para análise da contagem de células sanguíneas, revelando uma modulação na resposta inflamatória nos grupos que receberam ILIB ($p < 0,05$). O plasma e o cérebro também foram extraídos para medir os níveis de estresse oxidativo (EO) e marcadores inflamatórios, e os grupos TL e TH houve, uma modulação, da produção de interleucinas (IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1 e IFN- γ) entre estas, destaca-se o aumento significativo de interleucina anti-inflamatória e de outras que são responsáveis pela resposta a infecções pós-AVC, esses efeitos mostraram-se dependentes da dose. Observou-se uma diminuição do EO, do grupo TH com relação ao grupo AVC, na análise de oxidação proteica no plasma de 37% e no cérebro de 35%, contudo na peroxidação lipídica foi de 70% no plasma e 37% no cérebro. Ressalta-se que o ILIB neste modelo mostrou resultados surpreendentes. Devendo serem realizados estudos clínicos que padronizem a dose em humanos e a quantidade de aplicações, que comprovem o efeito, bem como, esclareçam os mecanismos específicos que permitem à ILIB exercer seus efeitos neuroprotetores.

Palavras-chave: Laser baixa intensidade. Fotobiomodulação sistêmica. Acidente Vascular Encefálico. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

ARAÚJO, S.O. Modulating effect of systemic laser therapy on inflammation in a stroke model. 2024. Master's Dissertation in Biotechnology - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo, Brazil. This master's dissertation analyzed the impacts of systemic photobiomodulation, through the non-invasive technique of Intravascular Laser Irradiation of Blood (ILIB), in an experimental model of global cerebral ischemia in mice. The main focus was to examine how this therapy acts in a dose-dependent manner in the recovery of brain injuries caused by bicarotid occlusion. The mice were exposed to this occlusion, after which ILIB was applied at a dose of 3.2 J (TL group) and 6 J (TH group), and the therapeutic effects were measured through functional and biochemical parameters. Motor evaluations of the mice were performed at two different times: before and after the induction of stroke, showing a significant improvement in the groups treated with ILIB, especially at the higher doses, improving the motor ability, strength and mobility of the mice, as well as a decrease in inactivity time. The macroscopic area of cerebral infarction was analyzed, and the treated group showed a reduction ($p < 0.01$) in the area damaged by ischemia. In addition, blood samples were collected for analysis of blood cell counts, revealing a modulation in the inflammatory response in the groups that received ILIB ($p < 0.05$). Plasma and brain were also extracted to measure oxidative stress (OS) levels and inflammatory markers, and in the TL and TH groups there was a modulation in the production of interleukins (IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1 and IFN- γ); among these, there was a significant increase in anti-inflammatory interleukin and others that are responsible for the response to post-stroke infections; these effects were dose-dependent. A decrease in OS was observed in the TH group compared to the AVC group in the analysis of protein oxidation in plasma of 37% and in the brain of 35%, however, in lipid peroxidation it was 70% in plasma and 37% in the brain. It is noteworthy that ILIB in this model showed surprising results. Clinical studies should be carried out to standardize the dose in humans and the number of applications, which prove the effect, as well as clarify the specific mechanisms that allow ILIB to exert its neuroprotective effects.

Key words: Low intensity laser. Systemic photobiomodulation. Stroke. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: ESQUEMA SIMPLIFICADO DOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DO AVCI. ...	17
FIGURA 02: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA LIBERAÇÃO E AÇÃO DO NO E O PAPEL NA VASODILATAÇÃO.	25
FIGURA 03: ESQUEMA DESENHO EXPERIMENTAL.	30
FIGURA 04: TÉCNICA DE APLICAÇÃO DO ILIB.	32
FIGURA 05: TÉCNICA DE OCLUSÃO BILATERAL DAS CARÓTIDAS.	33
FIGURA 06: ESQUEMA DE PREPARO DO HOMOGENATO DO CÉREBRO.	35
FIGURA 07: CAMPO ABERTO ADAPTADO.	36
FIGURA 08: GRIP TEST.	37
FIGURA 10: POLE TEST.	40
FIGURA 11: VALORES DA ÁREA MACROSCÓPICA DE INFARTO	43
FIGURA 12: RESULTADO CAMPO ABERTO	45
FIGURA 13: RESULTADOS DO TESTE WIRE-HANG	46
FIGURA 14: RESULTADOS DO GRIP-TESTE	47
FIGURA 15: RESULTADO POLE TEST	47
FIGURA 16: DOSAGEM DE IL-12P70.	49
FIGURA 17: DOSAGEM DE TNF.	51
FIGURA 18: DOSAGEM DE IFN- γ	52
FIGURA 19: DOSAGEM DE MCP-1.	53
FIGURA 20: DOSAGEM DE IL-10	55
FIGURA 21: DOSAGEM DA IL-6	56
FIGURA 22: ESTRESSE OXIDATIVO.	62
FIGURA 23: ESTRESSE OXIDATIVO TBARS.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos. Fonte: autora, com base nos dados fornecidos pelo fabricante (DMC).....	31
Tabela 2: Contagens da série branca sanguínea.....	59
Tabela 3: Contagens da série vermelha.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOPP – *Advanced Oxidation Protein Products* (Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas)
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AVC – Acidente Vascular Cerebral
- AVCI – Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
- AVE – Acidente Vascular Encefálico
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CBA – *Cytometryc Bead Array* (Matriz de Esferas Citométricas)
- CCO – Citocromo C Oxidase
- Ceua – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Damps – *Damage Associated Molecular Patterns* (Padrões Moleculares Associados a Danos)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EPM – Erro padrão da média
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FBM – Fotobiomodulação
- FBMV – Fotobiomodulação Vascular
- FGF – *Fibroblast Growth Factor* (Fator de Crescimento de Fibroblastos)
- GBD – *Global Burden of Disease* (Carga Global de Doenças)
- GCS – Guanilato ciclase
- GLB – Glicoproteínas Ligadoras de Bilirrubina
- GMPC – Guanosina Monofosfato Cíclico
- GTP – Guanosina Trifosfato
- IFN γ – Interferon Gama
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12p70 – Interleucina 12 p70
- IL-6 – Interleucina 6
- ILIB – *Intravascular Laser Irradiation of Blood* (Irradiação Intravascular de Sangue com Laser)
- Laser – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
- Led – *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)
- LLLT – *Low-Level Laser Therapy* (Terapia de Laser de Baixa Intensidade)

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (Proteína Quimioatraente de Monócitos-1)

MDA – Malondialdeído

NO – *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

PBMT – *Photobiomodulation Therapy* (Terapia de Fotobiomodulação)

RNL – Razão Neutrófilo-Linfócito

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Ácido Tiobarbitúrico)

TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TCA – *Trichloroacetic Acid* (Ácido Tricloroacético)

TLR – Receptores do tipo Toll

TNF – *Tumor Necrosis Fator* (Fator de necrose tumoral)

TTC – *2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride* (Cloreto de Trifeniltetrazólio)

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO	15
1.1.1.	<i>Epidemiologia</i>	15
1.1.2.	<i>Classificação e causas</i>	15
1.1.3.	<i>Fisiopatologia</i>	16
1.1.4.	<i>AVC e a inflamação</i>	18
1.2	LASER TERAPIA SISTÊMICA	19
1.2.1.	<i>Laser de Baixa Intensidade</i>	19
1.2.2.	<i>Utilização do ILIB</i>	20
1.2.3.	<i>Mecanismos de ação</i>	22
1.2.4.	<i>Ação de modulação da inflamação</i>	23
1.2.5.	<i>Ação hematológica</i>	25
1.2.6.	<i>Força e coordenação motora</i>	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	MODELO ANIMAL	29
3.2	IRRADIAÇÃO LASER INTRAVENOSA DE BAIXA INTENSIDADE	30
3.2.1.	<i>O equipamento utilizado</i>	30
3.2.2.	<i>Especificações da aplicação</i>	31
3.3	MODELO DE ISQUEMIA	32
3.3.1.	<i>Anestesia</i>	33
3.3.2.	<i>Oclusão das Carótidas</i>	33
3.3.3.	<i>Pós-operatório</i>	33
3.4	COLETA SANGUÍNEA	34
3.4.1.	<i>Análises de stress oxidativo e interleucinas</i>	34
3.4.2.	<i>Para o hemograma</i>	34
3.5	HOMOGENATO DO CEREBRO	34
3.6	MENSURAÇÃO DA ÁREA MACROSCÓPICA DE INFARTO	35
3.7	CAMPO ABERTO	36
3.8	GRIP TEST	37
3.9	TESTE DE RESISTÊNCIA DE AGARRE (WIRE HANG)	38
3.10	TESTE DE ESCALADA EM HASTE VERTICAL (POLE TEST)	39
3.11	HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA	40
3.12	DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS (AOPP)	40

3.13	AS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	41
3.14	DOSAGEM DE INTERLEUCINAS COM CBA	42
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	ÁREA MACROSCÓPICA DE INFARTO.....	43
4.2	CAMPO ABERTO.....	44
4.3	WIRE HANG E GRIP TEST	45
4.4	POLE TEST	47
4.5	CBA	48
4.5.1.	<i>IL 12-p70</i>	48
4.5.2.	<i>TNF</i>	50
4.5.3.	<i>IFN-γ</i>	51
4.5.4.	<i>MCP-1</i>	53
4.5.5.	<i>IL-10</i>	54
4.5.6.	<i>IL-6</i>	55
4.6	HEMOGRAMA COMPLETO	57
4.6.1.	<i>Série branca</i>	57
4.6.2.	<i>Série vermelha</i>	60
4.7	ESTRESSE OXIDATIVO	61
4.7.1.	<i>AOPP</i>	61
4.7.2.	<i>TBARS</i>	62
5	CONCLUSÕES	64
6	PERSPECTIVAS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO

1.1.1. Epidemiologia

O Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Com uma alta incidência global, estima-se que o Acidente Vascular Cerebral (AVC) seja responsável por cerca de 6,5 milhões de mortes anualmente, representando aproximadamente 11% de todas as mortes no mundo (GBD, 2020). No Brasil, apesar do declínio que houve nas taxas de mortalidade entre os anos de 2016 e 2019 (Thayabaranathan, 2022), estudos recentes indicam que o AVC é a segunda maior causa de morte no país, com uma taxa de mortalidade em torno de 104.450 óbitos em 2023, bem próximo do quantitativo, alarmante de igual forma, de mortes por isquemia cardíaca (117.192) (Ministério da Saúde, 2024), sendo de extrema importância estudos que busquem soluções para melhorar o prognóstico pós-AVC, e por consequência reduzir a taxa de letalidade.

Ao analisar a mortalidade global, observa-se que é mais alta em nações com renda baixa a média (Thayabaranathan, 2022), o que ressalta a necessidade de expandir as políticas de prevenção e cuidados do AVC no Brasil. Contudo, o desafio do AVC vai além da mortalidade, já que a maioria dos sobreviventes apresenta algum grau de incapacidade residual e aproximadamente metade não consegue recuperar a autonomia, o que resulta em mais internações e aumento dos custos públicos com o tratamento das sequelas e complicações decorrentes do AVC (Calvalcante, et al 2020; Silva, et al 2022; Benjamin, et al 2019 e Tate et al 2019).

1.1.2. Classificação e causas

Existem duas classificações para o AVC: Isquêmico e Hemorrágico. O AVCI é responsável por 85% dos casos de AVC. Este tipo de acidente acontece quando há uma interferência parcial ou total nos vasos sanguíneos causada por trombos ou êmbolos que interrompem a circulação cerebral, afetando diretamente a oferta de glicose e oxigênio necessários às células nervosas (Calvalcante, et al 2020; Silva, et al 2022; Nascimento, et al 2022; Lopes, et al 2022). Em contrapartida, um Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCH) ocorre em cerca de 15% dos casos; esse quadro se origina pela ruptura de vasos sanguíneos intracranianos ou nas meninges

encefálicas gerando extravasamento de sangue dentro desta região específica. (Calvalcante, et al 2020; Silva, et al 2022; Buchan, et al 2013; Nascimento, et al 2022).

Há três causas principais conhecidas para AVCI: a presença de placas arterioscleróticas nos vasos cerebrais, que representam 50% dos casos, seguidos por infarto cerebral cardiogênico (20%) e lesões em pequenos vasos, causando infartos lacunares (25%) (Bailey, 2012). Os outros 5% são atribuídos exclusivamente a outras causas como dissecação arterial extracraniana ou vasculite (Balch, 2020). Adams, todavia, seccionou as causas em 5 categorias, delimitando os subtipos de AVCI pela classificação TOAST: Aterosclerose de grandes artérias (AVC de grande vaso), oclusão de pequena artéria (AVC lacunar), cardioembolia, outra causa demonstrada, que poderia ser vasculopatias não ateroscleróticas ou distúrbios protrombóticos e, por último, causa indeterminada (criptogênica) (Adams et al., 2015).

1.1.3. Fisiopatologia

A fisiopatologia do AVCI envolve diversos mecanismos, desde a oclusão de um vaso sanguíneo até os processos celulares e moleculares subsequentes que levam à morte neuronal (Feske, 2021). Isto ocorre, quando a obstrução impede a chegada de oxigênio e nutrientes ao tecido cerebral, resultando em uma região de hipóxia e isquemia. A redução de oxigênio e glicose afeta a produção de adenosina trifosfato (do inglês, adenosine triphosphate – ATP), levando à disfunção das bombas iônicas, especialmente a bomba de sódio-potássio, resultando em despolarização celular e surto (Dirnagl, et al 1999). Isso desencadeia a liberação excessiva de glutamato, um neurotransmissor excitatório, permitindo a entrada de íons cálcio e sódio nas células, levando à excitotoxicidade e morte celular (Choi, 1992), como mostra a Figura 01.

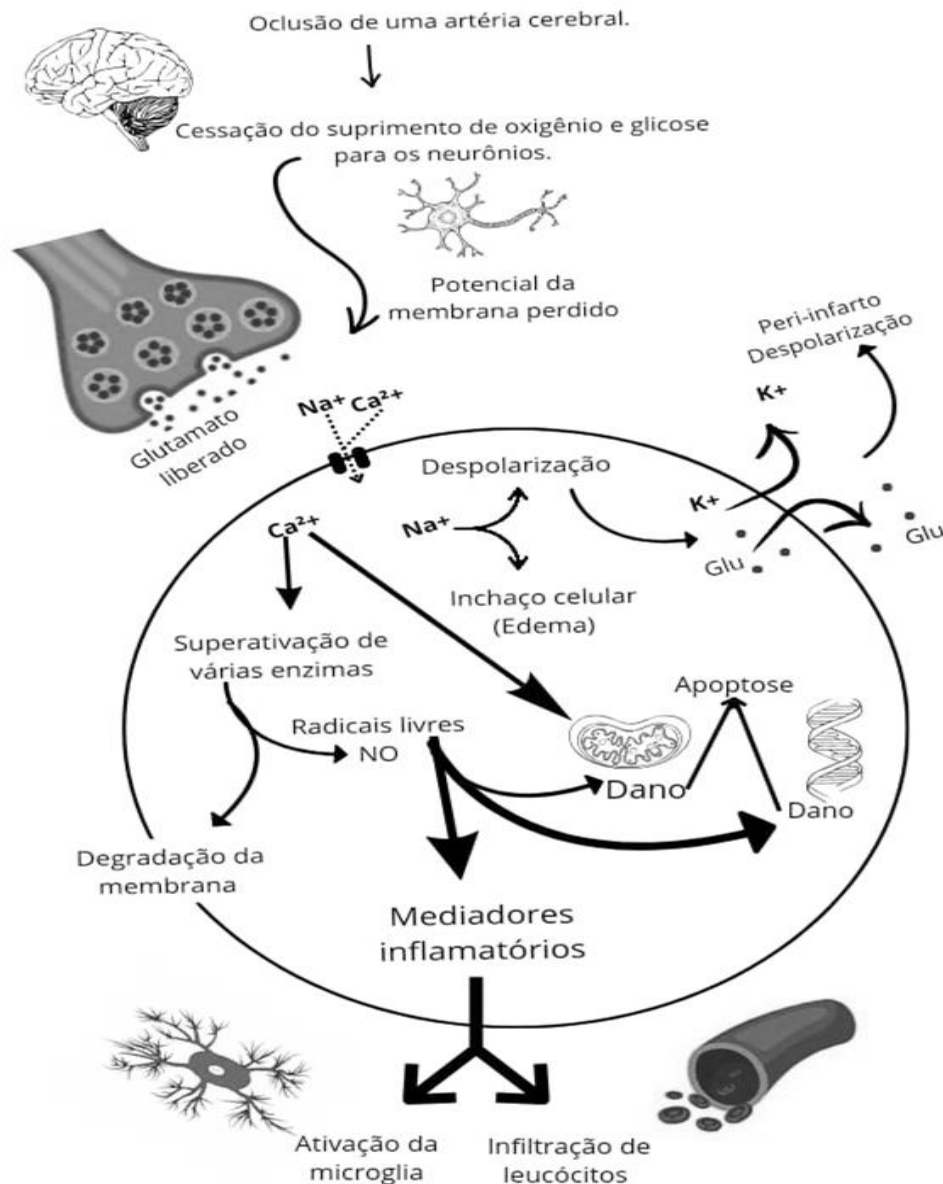


Figura 01: Esquema simplificado dos mecanismos fisiopatológicos do AVCI.

Inicia-se pela despolarização dos neurônios, em resposta à ausência energética. Ocorre uma ativação de receptores específicos de glutamato (Glu), que provoca níveis intracelulares de Ca^{2+} , Na^+ e Cl^- aumentados drasticamente, enquanto o K^+ é liberado no meio extracelular. A disseminação de Glu e K^+ no espaço extracelular pode desencadear a despolarizações peri-infarto. A água se desloca para o espaço intracelular, devido a gradientes osmóticos, levando ao inchaço celular (edema). O mensageiro intracelular universal Ca^{2+} ativa diversos sistemas enzimáticos (proteases, lipases, endonucleases, etc.). Radicais livres são produzidos, os quais danificam as membranas (lipólise), mitocôndrias e DNA, resultando em morte celular induzida por caspase (apoptose). Além disso, os radicais livres estimulam a produção de mediadores inflamatórios, que ativam a microglia e levam à invasão de células inflamatórias provenientes do sangue (infiltração de leucócitos), por meio da regulação positiva de moléculas de adesão endotelial.

Fonte: modificado de Dirnagl, et al 1999.

A reintrodução de oxigênio nas células durante a reperfusão pode levar à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que causam danos adicionais às membranas celulares, proteínas e DNA (Chan, 2001). A resposta inflamatória é desencadeada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. E uma das respostas a neuroinflamação é a ativação da micróglia, que resulta na descarga de vários componentes inflamatórios e citotóxicos responsáveis pela neuroinflamação e neurodegeneração (Teleanu, et al., 2022), o que contribui para dano tecidual (Wang et al, 2007).

1.1.4. AVC e a inflamação

Estudos recentes apontam para uma conexão entre a inflamação e os glóbulos brancos circulantes no sangue periférico, e um desfecho desfavorável após um AVCI (Nogueira et al., 2021). DeLong, em 2022, explora como a resposta inflamatória, incluindo a ativação de leucócitos, desempenha um papel crucial na progressão do dano cerebral após um AVCI. Bi, em 2021, discute o papel dos leucócitos na trombose associada ao AVCI. Assim, a inflamação desempenha um papel significativo na patogênese do AVCI, contribuindo para a lesão neuronal e a evolução da lesão cerebral (Kocic, et al., 2015; Licata, et al., 2006).

A via inflamatória no AVC é prontamente ativada em resposta à isquemia cerebral, levando à mobilização do sistema imunológico inato. Após o evento isquêmico, ocorre a liberação de padrões moleculares associados a danos (do inglês, Damage-Associated Molecular Pattern - DAMPs), que ativam os receptores do tipo Toll (do inglês, Toll-Like Receptors - TLR) e os receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, Toll-Like Receptors - PRR) em células imunes como micróglia, macrófagos e neutrófilos (Kawabori, et al., 2015). A resposta inflamatória após um AVC envolve tanto células intrínsecas do cérebro quanto células imunes circulantes que atravessam a barreira hematoencefálica comprometida (Ishikawa, et al., 2004; Yilmaz, et al., 2008). As células endoteliais, afetadas pela isquemia, liberam moléculas pró-inflamatórias que facilitam a infiltração de leucócitos, como neutrófilos e linfócitos, que intensificam a lesão cerebral por meio da produção de citocinas e substâncias tóxicas (Arvin, et al., 1996; Chopp, et al., 1996). A micróglia e os macrófagos, que são as principais células imunes residentes no cérebro, são ativados e podem tanto agravar a lesão neuronal quanto auxiliar na recuperação, dependendo do contexto (Jin, et al.,

2016). Os astrócitos também desempenham um papel na resposta inflamatória, produzindo moléculas que podem ser tanto neurotróficas quanto neurotóxicas, contribuindo para a formação de cicatrizes gliais que impactam a recuperação após o AVC (Nowicka, et al., 2008).

Com este ambiente de estímulos de estresse ocorre a ativação de caspases, que por sua vez irão mediar, por vias intracelulares específicas, as células neuronais a sofrerem necrose, ou seja, a morte celular descontrolada, devido a dano severo, ou apoptose, que é a morte celular programada (Mattson, 2000). As mortes celulares ocorrem rapidamente ao redor do núcleo da área isquêmica, entretanto, existe uma zona chamada penumbra isquêmica, onde as células estão comprometidas, mas ainda viáveis. Intervenções terapêuticas visam resgatar essas células para minimizar o dano cerebral (Hossmann, 1994; Lo, 2008). Esses mecanismos interagem complexamente e variam conforme o tempo e a extensão do AVC, determinando a gravidade dos danos e as possibilidades de recuperação, sendo que neste quesito, interagem as propostas terapêuticas existentes e em pesquisa como a fotobiomodulação.

1.2 LASER TERAPIA SISTÊMICA

1.2.1. Laser de Baixa Intensidade

A Terapia com o Laser de Baixa Intensidade (do inglês, Low Level Laser Therapy -- LLLT), também conhecida como laser terapia, é uma forma de fototerapia que utiliza a luz laser para estimular processos biológicos e promover a regeneração celular (Huang et al., 2011). Uma das vantagens da LLLT é sua natureza terapêutica, que atua na área cicatricial, bem como a preservação tecidual, aprimorando a circulação sanguínea e a oxigenação dos tecidos (Hamblin, 2013). É uma excelente opção e potencialmente eficaz para o tratamento do AVCI, por agir na diminuição do inchaço e inflamação, no aumento dos níveis de antioxidantes, na prevenção do apoptose e na regulação da ativação das células micróglias (Hamblin, 2013).

A laser terapia sistêmica é uma variante da LLLT, e tem ganhado destaque devido à sua capacidade de proporcionar efeitos terapêuticos em todo o organismo. Também chamada de ILIB (Intravascular Laser Irradiation of Blood), este tipo de terapia envolve a irradiação de luz laser diretamente em regiões arteriais específicas do corpo, como

por exemplo, nos humanos, a artéria radial, e nos camundongos, a artéria caudal (Malavazzi, et al 2023). É mais utilizado os comprimentos de onda de 660 nm para fonte de luz vermelha a 808 nm para infravermelho, essa janela terapêutica ocorre por ser uma região do espectro eletromagnético onde a água não absorve radiação de forma significativa, favorecendo o desencadeamento de processos fotoquímicos na região irradiada.

De acordo com o consenso internacional estabelecido em 2014, utiliza-se o termo “fotobiomodulação” (FBM) (Anders, et al. 2015), para se referir à estimulação e/ou efeitos inibitórios causados por fontes de luz não ionizantes (lasers e LEDs). Está entrega da energia luminosa a todos os componentes do sangue, estimula os efeitos positivos no organismo como um todo, também pode ser chamada de terapia de Fotobiomodulação Vascular (VFBM) (Fernandes, et al. 2021), ou seja, a irradiação sanguínea por meio de laser ou led. Entretanto quando se referido a bioestimulação de células do sangue, utilizando apenas o laser, para efeitos sistêmicos, pode-se especificar através do acrônimo ILIB.

Com este estudo, espera-se fornecer insights importantes sobre os potenciais benefícios do LLLT sistêmico no tratamento do AVC isquêmico, bem como contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta condição clínica desafiadora.

1.2.2. Utilização do ILIB

Essa abordagem é reconhecida por sua habilidade em regular a resposta do sistema imunológico, otimizar o fluxo sanguíneo e estimular a renovação celular, sendo considerada uma ferramenta eficaz em diferentes situações clínicas, incluindo as doenças neurodegenerativas. (Hamblin, 2017; Silva, 2023). A FBMV tem sido estudada e empregada em diversos parâmetros dosimétricos, incluindo comprimento de onda, potência e energia total (Malavazzi, et al. 2023). É uma ferramenta potencial e forma de tratamento para doenças que afetam a circulação sanguínea (Komori, et al. 2009).

A técnica ILIB foi desenvolvida na Rússia em 1970, de forma invasiva (Silva, 2023). No entanto, ao longo dos anos, foi modificada para uma abordagem não invasiva, com irradiação transcutânea sobre vasos sanguíneos de grande calibre, denominada ILIB

modificado (Rangel, 2021). Na revisão de Tuner&Hode, (2014), encontram-se diversos estudos que mostram que essa técnica promove respostas fisiológicas benéficas, como a aceleração do reparo tecidual e o aumento da liberação de fatores de crescimento, como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês: Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês - Fibroblast Growth Factor – FGF), promovendo também a angiogênese (Ferreira, et al. 2024).

O ILIB é a modalidade sistêmica da LLLT, e esta terapia tem sido amplamente aplicada em diversas condições clínicas, incluindo doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, fibromialgia e neuropatias. Estudos demonstram que essa terapia é eficaz na melhora da funcionalidade dos pacientes (Chow et al., 2009; Fukuda et al., 2013; Brosseau et al.,2000). No manejo da dor crônica, é uma tecnologia que tem demonstrado redução significativa dos níveis algícos, quando comparada ao placebo, em condições como a cervicalgia e a fibromialgia (Chow et al., 2009). Além disso, sua aplicação tem mostrado potencial em acelerar a recuperação pós-operatória e reduzir complicações cirúrgicas (Oliveira et al. 2013).

Dentre os principais benefícios da LLLT, pode-se citar o alto nível de segurança (Hamblin, 2017; Tuner e Hode, 2014), por apresentar poucos efeitos colaterais quando administrada corretamente (Yeh, et al. 2019). No entanto, é importante mencionar que pode ocorrer desconforto durante o procedimento e, em casos raros, uma piora temporária dos sintomas. É importante ressaltar que esta terapia é contraindicada em pacientes com tumores malignos não tratados, mulheres grávidas e em áreas com dispositivos eletrônicos implantados, como marcapassos (Oliveira, et al. 2014), sendo mantida essas contraindicações na literatura até o presente momento .

A tecnologia da LLLT está em constante evolução, com avanços como a redução do tamanho dos dispositivos e o aprimoramento de Lasers de diferentes comprimentos de onda. Essas inovações têm o potencial de expandir o uso clínico da LLLT, especialmente quando combinada com outras formas de tratamento. Entretanto novas pesquisas, devem se concentrar em estabelecer protocolos otimizados e entender os mecanismos de ação em diversas condições de saúde (Hamblin, 2017; Karu, 2003; Huang et al., 2009).

Evidências já foram descobertas indicando que a terapia transcraniana com LLLT pode modular a resposta inflamatória após um AVCI, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores do estresse oxidativo (Lapchak, 2010; Xuan et al., 2013). Portanto, é pertinente investigar a aplicação da LLLT de forma sistêmica e contínua (ILIB), no período pós-AVC agudo.

1.2.3. Mecanismos de ação

O principal mecanismo de ação da FBM é através da via mitocondrial, que promove uma série de eventos bioquímicos que resultam na modulação celular (Ferraresi et al, 2014). Nestes eventos a enzima mitocondrial Citocromo C Oxidase (CCO), uma enzima chave na cadeia respiratória intracelular, absorve a luz laser, o que aumenta a produção de ATP, que é essencial para a energia celular. Contudo, além da ação na produção de ATP, há um aumento de EROs, os quais agem como sinalizadores secundários para a regulação de fatores de transcrição envolvidos na proliferação, reparo e sobrevivência celular (Hamblin & Demidova, 2006; Chen, et al., 2011).

Segundo Hamblin & Demidova, 2006, a irradiação da LLLT pode modular a homeostase do cálcio intracelular, que é o protagonista de praticamente todos os processos no corpo humano, como a transmissão de sinais nos nervos, a expressão genética, e funções musculares. Hamblin, 2016, ainda refere que a ativação da CCO pela LLLT está relacionada à reversão da inibição enzimática causada pelo aumento de óxido nítrico (NO), promovendo a eficiência mitocondrial e os processos de bioestimulação (Chung et al., 2011; Karu, 2003; Huang et al., 2009), uma vez que essa molécula permite que a respiração mitocondrial retorne ao seu nível otimizado. Além disso, o NO liberado pode atuar sobre as guanilato ciclases solúveis, promovendo a vasodilatação, e este efeito contribui para o aumento da oxigenação e da entrega de nutrientes às áreas lesionadas, favorecendo a regeneração e reparo celular (Hamblin, 2008). Além disso, o NO também está associado à redução do estresse oxidativo e à melhora dos mecanismos antioxidantes (Wink, et al., 1995), reforçando seus efeitos terapêuticos da LLLT (Karu, et al., 2005).

Entretanto, a LLLT pode afetar a função celular por outras vias como com o aumento da enzima Superóxido Dismutase (do inglês, Superoxide Dismutase - SOD) (Tafur & Mills, 2008). Estudos sugerem que a aplicação do laser de baixa potência resulta em

um aumento na atividade da enzima SOD em vários modelos, o que pode reduzir os danos nos tecidos (Fillipin, et al., 2005; Parlato, et al., 1983). A SOD atua como a principal defesa enzimática no combate à geração de radicais livres dentro das células, facilitando a conversão do ânion superóxido (Silveira, et al., 2009).

É importante ressaltar que a isquemia cerebral gera um excesso de espécies reativas de oxigênio, resultando em danos oxidativos. Enzimas antioxidantes como a catalase desempenham um papel crítico na neutralização dessas espécies (Scott, et al., 1991), mas podem se tornar insuficientes durante o processo de reperfusão (Rosario, et al., 1996). Estudos experimentais demonstraram que a LLLT aumenta a expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase, promovendo a proteção neuronal contra o estresse oxidativo induzido pela isquemia (Mohammed & Khadrawy, 2022). A FBM, quando aplicada após o AVC, mostrou um aumento na atividade antioxidante, com elevação dos níveis de catalase e superóxido dismutase (Potapov, et al., 1995), resultando em menor lesão cerebral e melhor recuperação funcional (Davis & Pennypacker, 2017). Se essa abordagem fosse implementada imediatamente após a ocorrência do AVC, haveria a possibilidade de uma recuperação com um índice de sucesso mais elevado.

O grupo heme, encontrado na medula óssea e no fígado, possui uma configuração plana que abriga um anel de porfirina com um átomo de ferro central (ferroprotoporfirina). Esse grupo está presente na hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidase, catalase, triptofano pirolase e na sintase de óxido nítrico (ON). Processos fotodinâmicos de transferência de elétrons e até de energia podem acontecer com as porfirinas de ferro, resultando na formação de radicais livres ou oxigênio singlete, que podem ser responsáveis pela superexpressão de catalase e SOD (Maldotti, et al.1993).

1.2.4. Ação de modulação da inflamação

A laser terapia sistêmica tem sido bastante investigada pelos seus efeitos moduladores da inflamação, os quais influenciam positivamente os parâmetros hematológicos e leucocitários circulantes, bem como no remodelamento de tecidos e aspectos histológicos. Além disso, influencia também a regulação adequada dos marcadores pró-inflamatórios, incluindo Fator de Necrose Tumoral (do inglês, tumor

necrosis fator - TNF- γ), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (do inglês, Monocyte chemoattractant protein-1 - MCP-1) (Malavazzi et al., 2024). As citocinas têm um papel crucial na resposta inflamatória, tanto aguda quanto crônica, e estudos indicam que a fotobiomodulação inibe a produção excessiva dessas citocinas, contribuindo para a diminuição da inflamação tecidual e sistêmica (Hamblin; Demidova, 2006).

No artigo de Passarella e Karu (2014), os autores mencionam que a fotobiomodulação, resultante da absorção de radiação monocromática, pode influenciar células de defesa do organismo, como neutrófilos e macrófagos. Esses efeitos modulam a resposta inflamatória, podendo reduzir o processo inflamatório excessivo, promovendo um ambiente mais favorável à regeneração tecidual. A terapia regula a quimiotaxia de neutrófilos, controlando sua migração para os locais de inflamação. Em relação aos macrófagos, observa-se que a fotobiomodulação promove a transição dessas células de um fenótipo pró-inflamatório (M1) para um anti-inflamatório (M2), o que favorece a redução da inflamação e o reparo tecidual (Cury, 2013).

Outro efeito importante da FBM vascular é a melhoria no fluxo sanguíneo e na oxigenação dos tecidos, já que, pela estimulação dos canais de óxido nítrico (NO), há uma vasodilatação, o que aumenta o fluxo de oxigênio nos tecidos e facilita a remoção de metabolitos. (LANE, 2006). O NO difunde-se para as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, onde ativa a enzima Guanilato Ciclase Solúvel (GCs). Isso leva à conversão de Trifosfato de Guanosina (do inglês, Guanosine Triphosphate - GTP) em Monofosfato de Guanosina Cíclico (do inglês, Guanosine Monophosphate Cyclic - GMPc), resultando na redução da concentração de cálcio nas células musculares lisas. Como consequência, ocorre o relaxamento do músculo e a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a pressão arterial, como mostra a figura 02, (Moncada, 1997; Guyton & Hall, 2011). Estudos demonstram ainda que também resulta na redução do edema e do acúmulo de fluidos inflamatórios, sendo que este efeito é oriundo da regulação da permeabilidade capilar (Ferreira, et al., 2021).

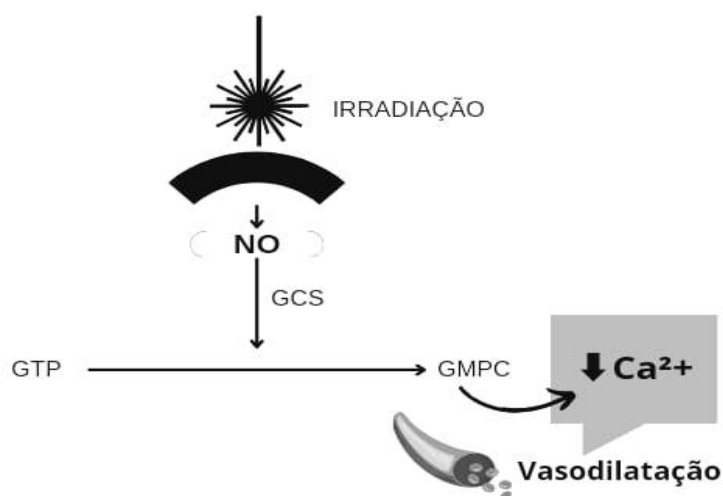


Figura 02: Esquema ilustrativo da liberação e ação do NO e o papel na vasodilatação. Fonte: Zago, 2006; modificado.

1.2.5. Ação hematológica

A terapia a laser no organismo tem efeitos moduladores sobre os constituintes do sangue. Estudos demonstram que a fotobiomodulação utilizando luz visível e infravermelha pode impactar a quantidade de citocinas no sangue, afetando as respostas das células do corpo (Zhevago & Samoilova, 2006). Destacam-se outros mecanismos da interação da luz com as células do sangue, principalmente os glóbulos vermelhos e as plaquetas, modificando suas funções. Por exemplo, a alteração da maleabilidade das hemácias, provocada pela irradiação do laser, interferindo por consequência na circulação sanguínea em vasos sanguíneos pequenos. Esse aumento na flexibilidade das células auxilia no transporte de oxigênio, favorecendo a oxigenação dos tecidos (Kujawa, et al., 2004). Adicionalmente, existem evidências de que a fotobiomodulação pode estimular a produção de hemoglobina, aprimorando ainda mais a capacidade de transporte de oxigênio pelas hemácias (Siposan & Lukacs, 1999 e 2000).

Quanto às plaquetas, o uso de LLLT parece ter um impacto na sua produção e ativação. Estudos clínicos mostraram um aumento no número de plaquetas após a laser terapia sistêmica, possivelmente devido ao estímulo de processos regenerativos

pela luz (Zhang et al., 2016).

De acordo com Zhu (2022), a LLLT é uma técnica não invasiva que pode aprimorar a microcirculação e a vitalidade do sangue. Além disso, o laser também pode gerar uma interação elétrica e do campo eletromagnético (campo elétrico, mais um campo magnético) com a viscosidade do plasma (Siposan & Lukacs, 2001). Dessa forma, ao redor dos glóbulos vermelhos pode ocorrer uma camada de proteína com carga elétrica alterada, após a irradiação, modificando a viscosidade sanguínea (Genkin, et al., 1989). Isso sugere que a laser terapia de forma abrangente pode ser extremamente benéfica em tratamentos essenciais para problemas circulatórios, como doenças cardiovasculares ou inflamatórias, resultando em uma melhora significativa na circulação sanguínea e no funcionamento das células.

1.2.6. Força e coordenação motora

No que diz respeito à força muscular, estudos que avaliaram o efeito da Terapia de Fotobiomodulação (do inglês, photobiomodulation therapy - PBMT) sobre força muscular, fadiga e capacidade funcional apresentaram resultados variados. As moléculas de porfirina também são encontradas nos músculos, o que poderia estar relacionado ao efeito da fotobiomodulação, que é visto em alguns estudos, que mostram um aumento de força e redução da fadiga com a PBMT, outros não encontraram melhorias significativas em comparação ao placebo (Oliveira, et al., 2023). Meta-análises indicaram que a PBMT não foi consistentemente superior ao placebo em diferentes protocolos de força e capacidade funcional, mas houve efeitos positivos na prevenção da fadiga induzida por exercício, com evidências de moderada a baixa confiança (Bezerra, et al., 2024).

Em termos de mobilidade, observa-se também uma ação da PBMT a nível sistêmico por meio do ILIB, que tem demonstrado efeitos benéficos na redução de processos inflamatórios e regeneração tecidual, fatores estes que influenciam diretamente a amplitude de movimento e a capacidade de mobilização. A melhora na circulação sanguínea e no reparo tecidual decorrente da fotobiomodulação contribui para o aumento da flexibilidade e redução da rigidez muscular, otimizando a mobilidade funcional em indivíduos com restrições de movimento (Leal-Junior et al., 2015). Esses achados sugerem que a laser terapia pode ser uma ferramenta valiosa no campo da reabilitação física, auxiliando na recuperação da força muscular, coordenação motora

e mobilidade de pacientes em diferentes contextos clínicos, principalmente quando aplicada de forma adjuvante em regimes de tratamento convencionais (Rouhani, et al.,2024)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos moduladores inflamatórios sanguíneos e no cérebro, da laser terapia sistêmica (ILIB) em modelo de isquemia cerebral global.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a força muscular pré e pós-oclusão bicarotídea;
- Realizar a contagem de leucócitos sanguíneos 48 horas após oclusão bicarotídea;
- Mensurar o estresse oxidativo plasmático e do tecido nervoso central;
- Analisar a atuação do ILIB na modulação inflamatória através da dosagem de interleucinas plasmática e no cérebro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO ANIMAL

Para a pesquisa foram utilizados camundongos swiss (*Mus musculus*), de 8 a 12 semanas, machos, com peso entre 30 e 40 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram retirados do Biotério Central e permaneceram em adaptação por 10 dias na sala de experimentação animal do Núcleo de Bioengenharia Tecidual. Os animais receberam água e ração, controle do ciclo de 12 horas claro/ escuro, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade $60\pm 5\%$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES, com o objetivo de garantir o bem-estar dos animais. A aprovação possui o número 14/2022 e inclui medidas para minimizar seu sofrimento, fornecendo condições adequadas ao ambiente em que vivem e utilizam métodos alternativos sempre que possível.

Os animais foram divididos em 4 grupos, descritos a seguir e como mostra a Figura 03:

- *Sham* – falso operado, passavam pela incisão cirúrgica, porém sem obstrução dos vasos arteriais.
- AVC – recebia a obstrução bilateral das carótidas.
- TL - Tratado com uma baixa dose do laser: animal com AVC submetido a laser terapia sistêmica com a dose de 3,2 J, e irradiação de 32 s (potência de 100mW). Aplicado na veia/ artéria caudal (Malavazzi, et al 2023), realizado 3 (três) doses (1 h, 24 h e 48 h após a oclusão).
- TH - Tratado com uma alta dose do laser: animal com AVC submetido a laser terapia sistêmica por 60 s, isto é, 6 J (potência de 100mW), realizado 3 (três) doses (1 h, 24 h e 48 h após a oclusão).

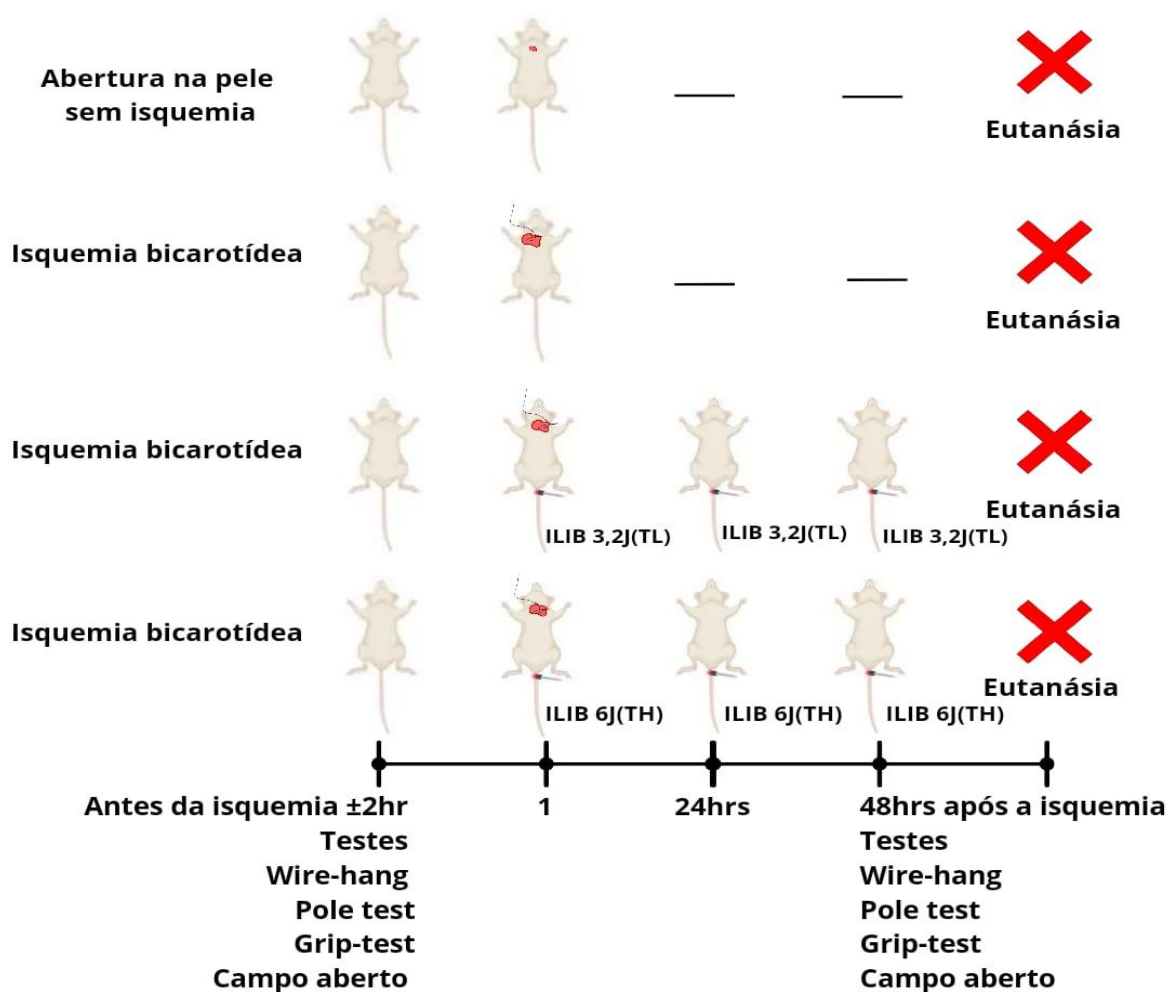


Figura 03: Esquema desenho experimental. Fonte: Autora

3.2 IRRADIAÇÃO LASER INTRAVENOSA DE BAIXA INTENSIDADE

3.2.1. Equipamento utilizado

O presente estudo utilizou o equipamento Therapy XT (DMC Equipamentos), um dispositivo avançado para a aplicação de laser terapia de baixa intensidade. Este equipamento é dotado de Diodos Emissores de Luz (do inglês, Light Emitting Diode - LEDs) e lasers de alta precisão que operam em comprimentos de onda específicos, otimizados para efeitos terapêuticos. O laser emite luz na região do vermelho e do infravermelho, sendo utilizada a luz na região vermelha com comprimento de onda de 660 nm, conhecida por sua eficácia em penetrar nos tecidos e estimular a atividade celular (Hamblin & Demidova, 2006). Além disso, o dispositivo possui uma potência ajustável de até 100 mW, permitindo um controle preciso da intensidade e duração da terapia. Durante as sessões, o dispositivo foi aplicado diretamente sobre a artéria

caudal, seguindo o protocolo padronizado de dosagem, para garantir consistência e reprodutibilidade dos resultados. A escolha do equipamento Therapy XT foi fundamentada em sua variedade de parâmetros dosimétricos, conforme a Tabela 01, além de proporcionar uma terapia não invasiva com mínimo desconforto para os animais.

Potência	100 mW \pm 20% de potência
Modo	Contínuo (CW)
Cumprimento de onda	660 nm \pm 10 nm
Energia	3,2 J (TL) e 6 J (TH)
Tempo de exposição	32" (TL) e 60" (TH)
Irradiância	Na veia/artéria caudal
Número de tratamentos	3 dias consecutivos, 1 vez por dia
Fluência	~35 J/cm ² (Dose de 1 J)

Tabela 01: Parâmetros dosimétricos. Fonte: autora, com base nos dados fornecidos pelo fabricante (DMC Equipamento).

3.2.2. Especificações da aplicação

A fotobiomodulação vascular foi realizada na veia/artéria caudal, com os parâmetros descritos na Tabela 01, sendo esta região a escolha em vários estudos (Amjadi, et al., 2019; Roshchina, et al., 2003; Tomimura, et al., 2014; Lopez et al., 2022; Martinelli, et al., 2022; Yamaikina, et al., 2012). Para o procedimento, os animais foram contidos manualmente e LLLT sistêmica foi administrada por via transcutânea em um único ponto de contato direto com a pele. Este ponto é localizado na região ventral da base da cauda, região de grande fluxo sanguíneo (Lopez, et al., 2022), sendo que a aplicação foi feita em um ângulo de 90 graus entre o transdutor e a pele para evitar a refração do feixe, conforme a Figura 04.

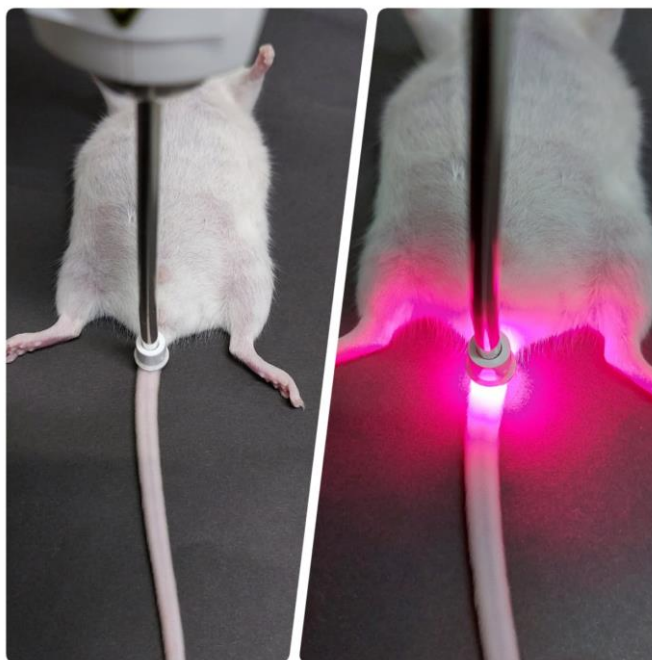


Figura 04: Técnica de aplicação do ILIB. Fonte: autora.

Existe grande déficit na literatura quanto a doses de laser terapia no modelo animal com camundongos, contudo, Wang, 2020, avaliou a fotobiomodulação em isquemia cerebral global, sendo que os autores encontraram que PBM nas doses de 3,0 e 4,0 J foram benéficas em uma proporção de 78-80% dos neurônios, enquanto doses menores que 1,0 e 2,0 J foram mostradas como menos protetoras (Wang, et al., 2020). Desta forma foi escolhida a dose de 3,2 J para o grupo nomeado como tratado com baixa dose (do inglês, Treated with Low dose - TL) e o aproximadamente o dobro 6 J para os animais tratados com alta dose (Treated with High dose - TH).

3.3 MODELO DE ISQUEMIA

Foi utilizado o modelo de isquemia bicarótídea, como ferramenta para estudo dos efeitos moduladores da inflamação do ILIB pós-AVC agudo, amplamente utilizado em estudos pré-clínicos (Tripathi & Singh, 2021). Este modelo envolve a oclusão temporária de uma artéria carótida e oclusão permanente da outra, para induzir uma isquemia cerebral global em animais de laboratório, como camundongos Swiss (Longa et al., 1989). Este modelo reproduz muitos dos aspectos patofisiológicos do AVC isquêmico humano e é amplamente reconhecido como uma ferramenta importante para o estudo das terapias neuroprotetoras (Speetzen, et al, 2013).

3.3.1. Anestesia

É crucial garantir que os camundongos estejam adequadamente anestesiados e livres de dor durante todo o procedimento. Desta forma, os camundongos foram anestesiados com uma combinação de cetamina e xilazina na proporção de 9:1, administrada via injeção intraperitoneal. A cetamina é utilizada para a indução da anestesia, enquanto a xilazina é um sedativo que potencializa os efeitos da cetamina (Mechelinck, et al., 2019).

3.3.2. Oclusão das Carótidas

A artéria carótida comum esquerda foi ocluída permanentemente, enquanto a artéria carótida comum direita foi ocluída temporariamente por 1 h. Após esse período, a oclusão foi removida para permitir a reperfusão sanguínea. A incisão cirúrgica, cervical dos animais foi então suturada, seguido de assepsia local (Speetzen, et al, 2013).

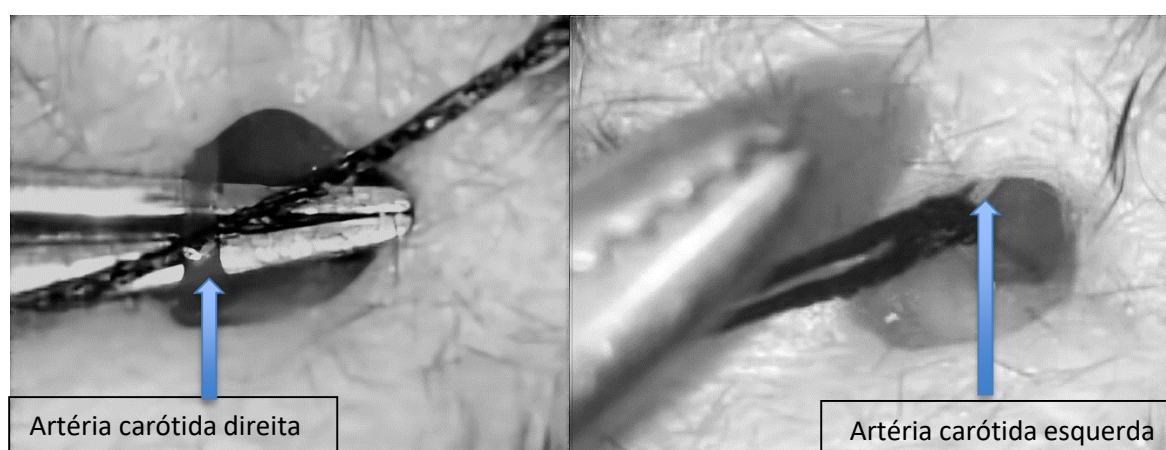


Figura 05: Técnica de oclusão bilateral das carótidas.

Fonte: autora.

3.3.3. Pós-operatório

Após o procedimento cirúrgico, os camundongos foram colocados em uma caixa de recuperação, com acesso a ração e água adequado. O ambiente foi mantido limpo e confortável, para o bem-estar dos animais, com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade $60\pm 5\%$. Utilizou-se como substrato maravalha limpa. Os animais eram monitorados regularmente para detectar possíveis sinais de sofrimento ou complicações. Após 48 h do período de AVC, os camundongos foram submetidos à eutanásia, de acordo com

os protocolos éticos e regulamentares (Concea, 2018), para posterior análise dos tecidos e avaliação dos danos cerebrais causados pela isquemia e reperfusão.

3.4 COLETA SANGUINEA

3.4.1. Análises de stress oxidativo e interleucinas

O sangue foi coletado inicialmente por punção no ventrículo direito após toracotomia, em microtubos. O sangue foi coletado imediatamente e centrifugado a 115 g por 10 min em uma centrífuga refrigerada. O soro resultante foi separado e armazenado a -20°C até o momento das análises.

3.4.2. Hemograma

O sangue foi coletado por punção no ventrículo direito após toracotomia, em microtubos com heparina, havendo sido levado em reservatório isolante térmico com gelo ao laboratório parceiro para as análises, de forma imediata.

3.5 HOMOGENATO DO CÉREBRO

Para obter o lisado do cérebro foi dissolvido em uma solução conhecida como Greenberger Lysis Buffer (GLB) (Milano et al, 2008), conforme a figura 06. Primeiramente os tecidos foram coletados e armazenados a -80°C e, subsequentemente, suspensos em GLB, composto por: Tampão Fosfato-Salino (do inglês, phosphate buffered saline – PBS), diluído 1:1, 150 mM NaCl, 15 mM Tris, 1 mM MgCl₂·H₂O, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, Inibidor de Protease 1:100 (Sigma – AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin). Os cérebros foram homogeneizados e então colocados no gelo por 30 min. Os tecidos rompidos foram centrifugados a 3470 g por 7 min, e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 420 g por 10 min. Uma alíquota foi retirada para medir o estresse oxidativo através dos produtos de oxidação avançada de proteínas (do inglês, advanced protein oxidation product - AOPP) (Witko-Sarsat, et al., 1996; Cao, et al., 2014) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, thiobarbituric acid reactive substances -TBARS) (Costa et al., 2006; Chakraborty et al., 2009).

O homogenato do cérebro também foi utilizado para realizar dosagens de interleucinas utilizando citometria de fluxo com o kit de inflamação Matriz de Esferas

Citométricas (do inglês, Cytometric Bead Array – CBA) (BD, Breda, Holanda), seguindo as instruções do fabricante.



Figura 06: Esquema de preparo do homogenato do cérebro. Fonte: Autora.

3.6 MENSURAÇÃO DA ÁREA MACROSCÓPICA DE INFARTO

A coloração com Trifenil Tetrazólio (TTC) foi padronizada como um método eficaz para medir a área de infarto cerebral (AVC) em estudos pré-clínicos. Este método foi idealizado por Bederson et al. (1986), e vem sendo utilizado desde então para avaliar o tamanho do infarto em estudos experimentais de neuroproteção e terapias pós-AVC, sendo considerada um método padrão em muitos laboratórios de pesquisa. O TTC é utilizado como corante para diferenciar tecido cerebral viável de tecido necrótico em modelos experimentais de AVC em animais. O TTC reage com as enzimas mitocondriais ativas nos tecidos viáveis, resultando em uma coloração vermelho-vivo, enquanto as áreas infartadas, onde há perda de função mitocondrial, permanecem esbranquiçadas (Bederson, et al., 1986).

O procedimento para mensuração da área de infarto utilizando 2,3,5-trifeniltetrazólio (vermelho de tetrazólio, TTC, Sigma Aldrich) começa com a extração cuidadosa do cérebro, após 48 h do AVE, seguida de cortes em fatias de 2 mm, que são colocados

em microtubos de 1,5 ml. As fatias são coradas com TTC por 30 min a 37°C em Banho Seco e os cortes são colocados nas lâminas e escaneados. Após a coloração, a solução de TTC é removida, e o tecido cerebral é fixado com paraformaldeído a 4%, conforme Zhang & Chen, 2012. A mensuração da área de infarto foi realizada no software Image J, onde a escala e o limiar de cor são ajustados para delimitar a região de interesse, sendo que a área selecionada é automaticamente calculada pelo programa.

3.7 CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto, (do inglês *Open Field* - OF), é uma metodologia amplamente utilizada para avaliar comportamentos de exploração, ansiedade e atividade locomotora em modelos animais, particularmente em estudos com roedores (Prut & Belzung, 2003). Este teste é conduzido em um ambiente aberto, geralmente em uma arena quadrada ou retangular, que possui paredes baixas para evitar a fuga dos animais. A arena é frequentemente marcada em quadrantes para facilitar a análise do comportamento (Kraeuter, et al., 2018).

O teste campo aberto foi realizado com limpeza da arena, ou seja, antes de cada teste para evitar a interferência de odores, em temperatura ambiental de 22±2°C. Os animais são colocados na arena por um período de aclimação de 2 min, permitindo que se familiarizem com o ambiente. Durante 5 min, o comportamento dos animais é observado e registrado, como mostra a Figura 07. Os dados coletados são analisados utilizando o software Anymaze.

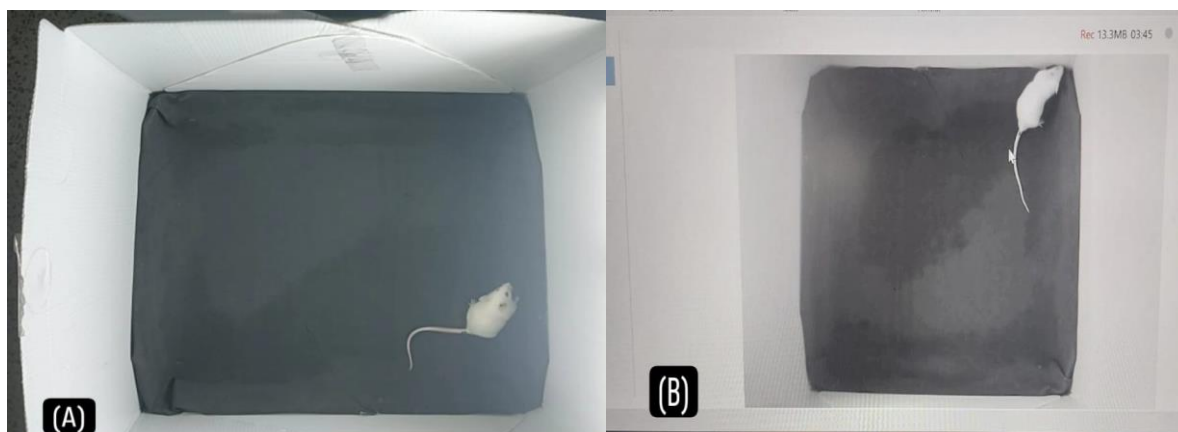


Figura 07: Campo aberto adaptado. A: animal posicionado na arena, sendo filmado. B: imagens das filmagens sendo processadas no software. Fonte: Autora, 2024

3.8 GRIP TEST

O *Grip test*, também conhecido como teste de força de preensão, é uma avaliação comportamental frequentemente utilizada em modelos experimentais com camundongos para medir a força de preensão das patas anteriores. Este teste é útil na investigação de deficiências motoras e na avaliação de intervenções terapêuticas que visam melhorar a função motora (Bertelli, et al., 1995).

Para a realização deste teste, os camundongos foram colocados em uma grade horizontal. Após uma breve adaptação ao ambiente, em temperatura ambiental de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, os camundongos são incentivados a se agarrar à grade. A força de preensão foi medida quando o animal era gentilmente puxado para baixo, e a força é quantificada pelo peso que o animal consegue suportar antes de soltar a grade. Neste teste foram realizadas 10 (dez) medições em cada animal.

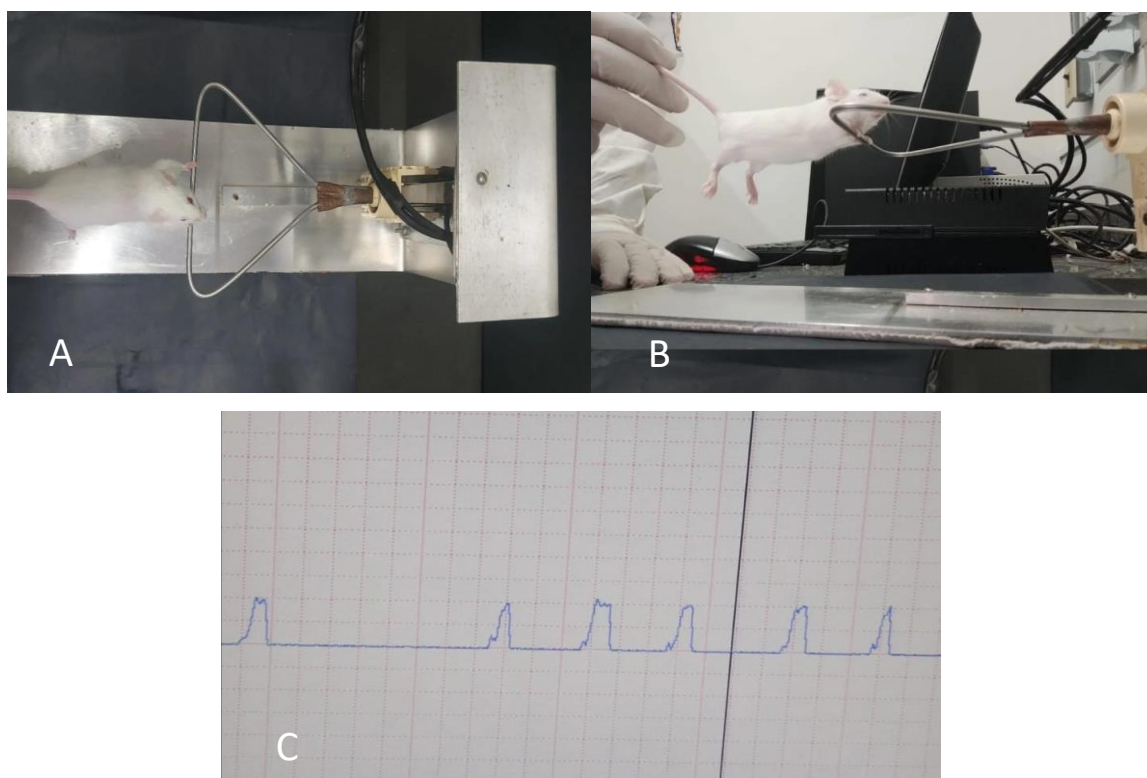


Figura 08: *Grip test*. A: animal posicionado na haste do equipamento. B: Fonte: pesquisador gentilmente puxando o animal para baixo, realizando a medição. C: Registro das forças exercidas em gráficos. Fonte: Autora, 2024.

3.9 TESTE DE RESISTÊNCIA DE AGARRE (*WIRE HANG TEST*)

A avaliação da força de preensão do fio (MIYAKAWA et al., 2001) foi realizada seguindo o método descrito por Sango et al. (1996), e avalia a força neuromuscular. Os animais foram aclimatados à sala experimental (com temperatura ambiental de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e, pelo menos uma hora antes da realização do experimento, foram manuseados pelo experimentador.

O dispositivo utilizado foi uma tela quadrada de metal com moldura de madeira. Inicialmente, o animal foi colocado sobre a grade e agitado brevemente para que se acostumassem, conforme mostra a Figura 09. Em seguida, a grade foi invertida e suspensa a 20 cm acima de uma caixa cheia com maravalha. Essa altura era suficiente para permitir que o animal se agarrasse à posição sem ser ferido durante a queda. O tempo decorrido para a queda foi registrado utilizando um cronômetro.

O teste foi realizado antes da isquemia e 48 h após, e foram permitidas 3 tentativas. Para a análise dos dados, foi estabelecido um limite de 5 min.

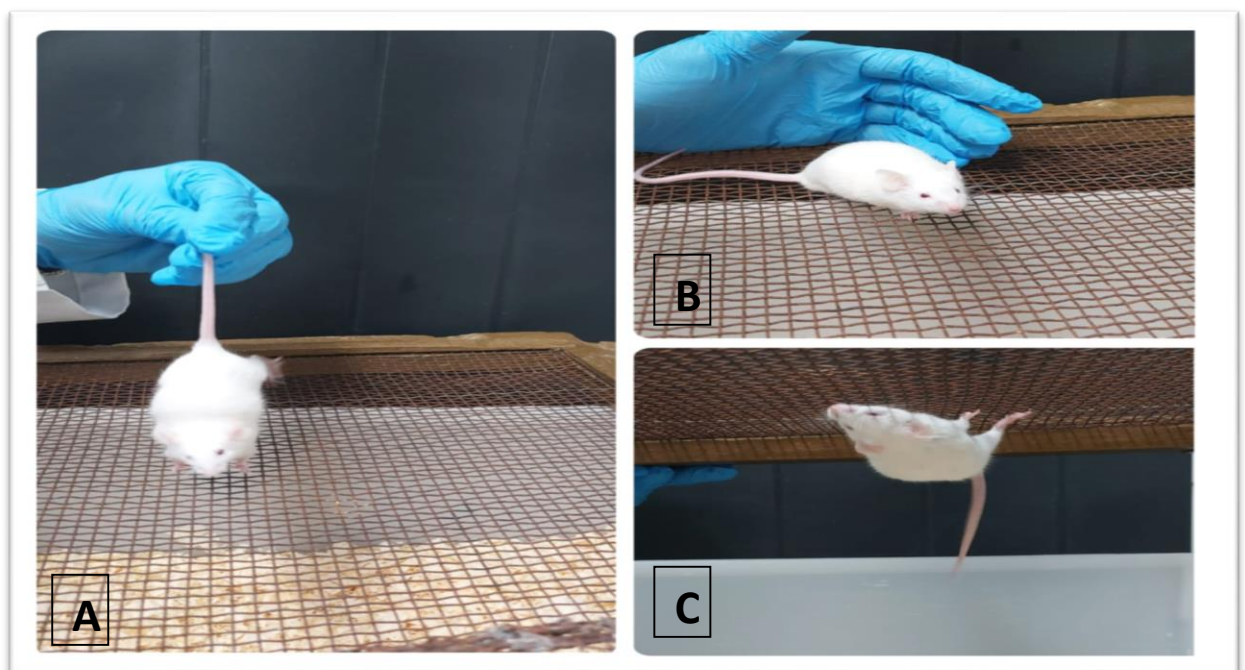


Figura 09: *Ware hang test*. A: Animal colocado na grade. B: Grade levemente agitada para o animal aderisse a estrutura. C: Inversão da tela. Fonte: Autora, 2023

3.10 TESTE DE ESCALADA EM HASTE VERTICAL (*POLE TEST*)

O *Pole Test* é uma ferramenta utilizada para avaliar a bradicinesia (OGAWA et al., 1985), tornando-se um instrumento eficaz para avaliar distúrbios do movimento (MATSUURA et al., 1997). Este teste avalia a integridade dos gânglios da base, necessários para que os animais tenham destreza nos membros anteriores para agarrar uma haste e virar-se para baixo.

A estrutura utilizada é composta por uma haste metálica de 45 cm de altura e diâmetro de até um centímetro, envolta ou enrolada em material curativo (gaze ou atadura), como mostra a Figura 09, em temperatura ambiental de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram colocados no topo desta barra com o rosto voltado para cima enquanto era medido quanto tempo levavam desde a orientação em direção à parte inferior até chegar do topo à base durante a escalada.

O tempo de subida foi medido por meio de um cronômetro. O teste foi realizado antes e 48 h após a isquemia, sendo permitidas três tentativas de escalada para cada animal. Se um animal não conseguisse escalar o poste em nenhuma de suas tentativas, era atribuído um limite de tempo máximo de 5 min.

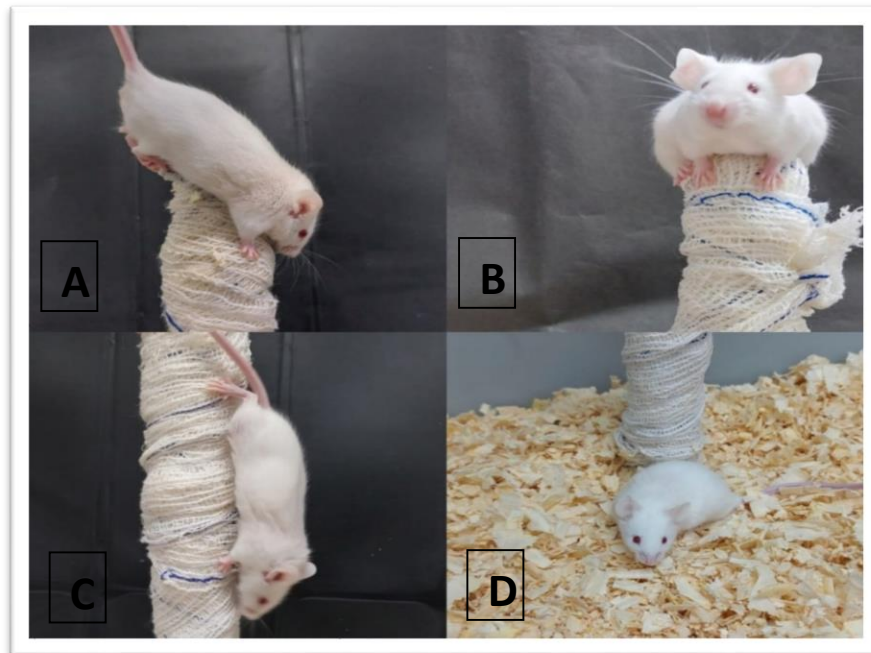


Figura 10: Pole test. A: Animal colocado no topo da haste. B: o animal se direciona para baixo. C: Realizando a descida. D: Atinge a superfície da caixa com maravalha. Fonte: Autora, 2023

3.11 HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA

No procedimento de coleta de sangue para a realização do hemograma, as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina como anticoagulante e imediatamente armazenadas a 4°C e processadas dentro de 2 h após a coleta. O hemograma completo foi realizado utilizando o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100, o qual permite a contagem diferencial de leucócitos, eritrócitos e plaquetas com alta precisão.

3.12 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS (AOPP)

O AOPP resulta da interação de Estresse Oxidativo (EO) entre a albumina e o ácido hipocloroso, servindo como um relevante indicador de lesão proteica induzida pela oxidação, o que reflete a condição de estresse oxidativo do organismo (Nasrallah, et al., 2013). Um fator significativo que contribui para as sequelas após o AVE é o estresse oxidativo. Com base nisso, vários estudos utilizam AOPP como ferramenta de mensuração EO em pacientes que sofreram infarto cerebral (Kotur-Stevuljevic; et al., 2015; Taffi, et al., 2008; Fanaeia, et al., 2014; Fernando, et al., 2018; Chen; et al., 2018).

Para determinação do AOPP, analisam-se o soro e o homogenato do cérebro, ambos diluídos numa proporção de 1:4 utilizando PBS entregue diretamente na microplaca. Isto envolve misturar 40 µL de soro com 160 µL de PBS. Em seguida, adiciona-se 10 µL de iodeto de potássio (KI) na concentração de 1,16 M e ácido acético glacial ultrapuro em quantidades de até 20 µl. A leitura de absorção é feita imediatamente no comprimento de onda de 340 nm, garantindo resultados precisos testando todas as amostras três vezes em testes em triplicado.

Para criar a curva padrão, foi preparada uma solução estoque de Cloramina T a 100 µM dissolvendo 7,04 mg de Cloramina Tri-hidratada em 250 mL de água destilada e uma solução de KI a 1,16 M dissolvendo 48,14 g de Iodeto de Potássio na mesma quantidade de água destilada. Diferentes concentrações para as soluções padrão

foram utilizadas, preparadas na microplaca adicionando PBS, KI e ácido acético, de acordo com o protocolo, enquanto agitava-se a placa durante 6 min antes de lê-la no comprimento de onda de 340 nm.

Os resultados obtidos foram expressos como concentrações de AOPP em μM de Cloramina T, com base na curva padrão. Esta metodologia garante a determinação precisa e confiável dos níveis de AOPP no soro, o que é essencial para estudos relacionados ao estresse oxidativo.

Para complementar a análise de AOPP, é necessário medir os níveis de proteína total no plasma, utilizando um espectrofotômetro Nanodrop®. Para fazer isso, 1 μL de plasma foram pipetado diretamente no sensor do equipamento que mede a concentração de proteína com base na absorbância a 340 nm. Esses valores foram utilizados para normalizar as concentrações de AOPP para quantidades totais de proteína, garantindo que as variações observadas nos níveis de AOPP não são devidos a diferenças na concentração de proteínas.

3.13 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Costa et al., 2006, descreveram o método de análise das espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). A avaliação do estresse oxidativo utilizando o método TBARS ocorre através da medição de Malondialdeído (MDA), um indicador de dano oxidativo lipídico.

O procedimento da análise dos produtos originados do processo de peroxidação lipídica induzida por radicais livres (Chakraborty et al., 2009), foi realizado adicionando 75 μL de água destilada, 50 μL de soro, 125 μL de Ácido Tricloroacético (do inglês, Trichloroacetic Acid - TCA) 17,5% e 125 μL de Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, Thiobarbituric Acid - TBA) 0,6% em tubos de ensaio. As amostras foram misturadas bem e incubadas em banho-maria fervente por 20 min, utilizando um bloco de aquecimento.

Após a incubação, os tubos foram resfriados em gelo, em seguida, foi adicionado 125 μL de TCA 70% às amostras, que foram novamente bem misturadas e incubadas por 20 min no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante resultante foi transferido para uma placa de ELISA, com 150

μL de cada amostra em cada poço, e a absorbância foi lida a 534 nm. A concentração do MDA foi calculada utilizando a fórmula: $(\text{absorbance a } 534\text{nm}/(\text{coeficiente de extinção molar MDA} \times \text{trajeto ótico}) \times \text{diluição})$, sendo que $\text{MDA} = (\text{Absorbância a } 534 \text{ nm}/0,034476) \times 10$.

3.14 DOSAGEM DE INTERLEUCINAS COM CBA

Para realizar o CBA no plasma, o sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm para coletar o plasma. Foi utilizado também o homogenato do cérebro (descrito anteriormente) para dosagem das citocinas IL-6, IL-12p70, IL-10, TNF e IFN- γ utilizando o kit CBA (Cytometryc Bead Array - Mouse Inflammation Kit) da BD Biosciences®. O princípio do método de dosagem com o kit CBA consiste na ligação de anticorpos com as citocinas de interesse. O kit oferece cinco grupos de microesferas, apresentando intensidades de fluorescência diferentes, revestidas com anticorpos específicos para cada tipo de citocina, denominadas “esferas de captura”. Para as dosagens, as esferas de captura específicas para cada citocina, foram agrupadas e posteriormente misturadas com 25 μL de cada amostra, a fim de permitir a ligação das esferas de captura com as possíveis citocinas presentes na amostra.

Em seguida foram adicionados a essa mistura anticorpos monoclonais anti-citocinas de camundongos, conjugados com o Fluorocromo Ficoeritrina (do inglês, Fluorochrome Phycoerythrin - PE). Após esta etapa, a fluorescência de um total de 5000 microesferas por amostra foi lida em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD), com base em Gráficos de Tamanho versus Granulosidade. As populações das microesferas foram detectadas de acordo com suas respectivas intensidades de fluorescência, se distribuindo ao longo de eixo Y (detector de fluorescência 4, PE, o qual capta luz no comprimento de onda 650 nm, correspondente à cor vermelha). O mesmo procedimento foi realizado previamente para a construção de uma curva padrão com concentrações de 20 a 5000 $\mu\text{g/ml}$, e empregada para determinar as concentrações de cada citocina na amostra em análise.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Foi realizada a ANOVA como teste estatístico dos dados e o teste de Fisher para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As

análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism, versão 8 (Software Graph Pad, La Jolla, CA, Estados Unidos).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÁREA MACROSCÓPICA DE INFARTO

Verificou-se uma diferença significativa da área macroscópica de infarto, entre o grupo TH e os demais grupos. O grupo TH apresentou uma região de infarto significativamente menor quando comparado aos grupos AVC e TL, como mostra a Figura 11 (TH: $19,864 \text{ mm}^2 \pm 2,622 \text{ mm}^2$; AVC: $43,848 \text{ mm}^2 \pm 1,975 \text{ mm}^2$; TL: $31,473 \text{ mm}^2 \pm 0,692 \text{ mm}^2$), indicando que a alta dose de laser terapia sistêmica foi mais eficaz na redução do dano nos tecidos. Os resultados mostram que o tratamento com alta dose de laser terapia sistêmica teve maior eficácia em reduzir o tamanho do infarto visível a olho nu, se comparado com doses menores. Isso ressalta a possível ação neuroprotetora no caso de um AVC, como evidencia Huang, et al., 2012 em seu estudo que a LLLT confere após a lesão cerebral além da neuroproteção, uma redução da inflamação e a estimulação da neurogênese, nesta pesquisa, de igual forma houve uma redução do tamanho da área da lesão em camundongos tratados com LLLT.

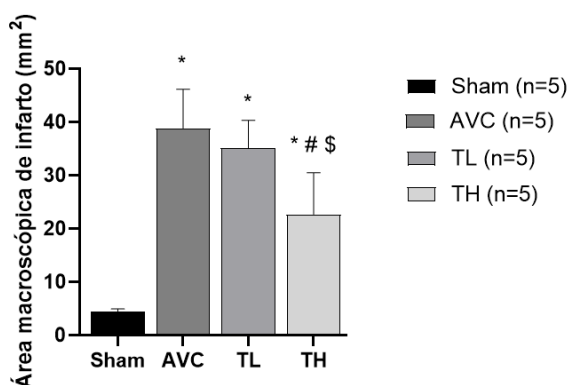


Figura 11: Valores da área macroscópica de infarto (em mm²) dos grupos experimentais: *Sham* compreende aos animais que sofreram procedimento cirúrgico sem processo de obstrução das carótidas, AVC trata-se de animais que tiveram obstrução das carótidas, mas sem processo de irradiação, TL representando os animais que foram irradiados com laser a 3,2J e TH os animais que foram irradiados a 6,0J. *Sham*, AVC, TH e TL, n=5 por grupo. O grupo TH apresentou uma área de infarto significativamente menor em relação aos grupos AVC e TL. Nos quais os símbolos * vs *Sham*, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de *post hoc* de Fisher. Expressos como média \pm EPM.

A disfunção mitocondrial é central nos danos cerebrais, como no AVC, contribuindo para a diminuição da produção de ATP, excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, reactive oxygen species - ROS) e ativação de vias apoptóticas que levam à morte celular (Balch, et al., 2020). No AVCI, a interrupção do fluxo de oxigênio e nutrientes agrava essa disfunção. Após a análise dos resultados, verifica-se que a LLLT tem demonstrado ser um tratamento promissor, atuando nas mitocôndrias para aumentar a produção de energia, reduzir o estresse oxidativo e melhorar a resposta celular, protegendo o cérebro contra danos neurológicos ao restaurar a função mitocondrial, tal como também verificado por Yang, et al., 2020.

4.2 CAMPO ABERTO

No teste de campo aberto, ao avaliar a variável tempo móvel, observou-se que o grupo TH permaneceu significativamente mais tempo em movimento do que os demais grupos (*Sham*: 214,70 s \pm 7,51 s; AVC: 211,20 s \pm 11,50 s; TL: 216,26 s \pm 10,11 s e TH: 247,66 s \pm 6,43 s). Este resultado também é visto em estudos de casos de pacientes que receberam PBM após AVC e apresentaram melhorias na capacidade de caminhar (Stephan, et al., 2023). Além disso, esse grupo também apresentou um tempo imóvel consideravelmente menor em comparação aos outros grupos (*Sham*: 85,30 s \pm 7,51 s; AVC: 80,32 s \pm 6,66 s; TL: 83,74 s \pm 10,11 s e TH: 56,96 s \pm 8,22 s), destacando-se no parâmetro de atividade motora. Este resultado corrobora com o estudo de Xu, et al., 2016, no qual, ao avaliar o efeito LLLT na depressão, também encontrou uma redução do tempo de imobilidade no grupo que recebeu a luz laser. Quanto à distância percorrida pelos animais, o grupo TH mostrou uma diferença significativa quando comparado ao grupo AVC (AVC: 7,39 m \pm 0,71 m e TH: 9,51 m \pm 0,61 m), percorrendo uma maior distância durante o teste, em consonância ao achado de Silveira et al., 2016, que, de igual forma ao grupo tratado com LLLT, apresentou uma distância percorrida maior no teste de campo aberto.

Em relação à velocidade média, o grupo TL apresentou uma diferença significativa em comparação ao grupo AVC (AVC: 0,02 m/s \pm 0,001 m/s e TL: 0,032 m/s \pm 0,003 m/s), demonstrando uma maior velocidade de movimento. Essa análise evidencia a eficácia do tratamento, tanto com alta dose de laser terapia sistêmica (TH) quanto com baixa dose (TL), que também promoveu impacto significativo na velocidade de locomoção,

de acordo com a Figura 12. Estes resultados reforçam os achados de Lampl et al., 2007 que LLLT melhora os déficits de função motora pós AVCI (Lapchak, et al., 2007).

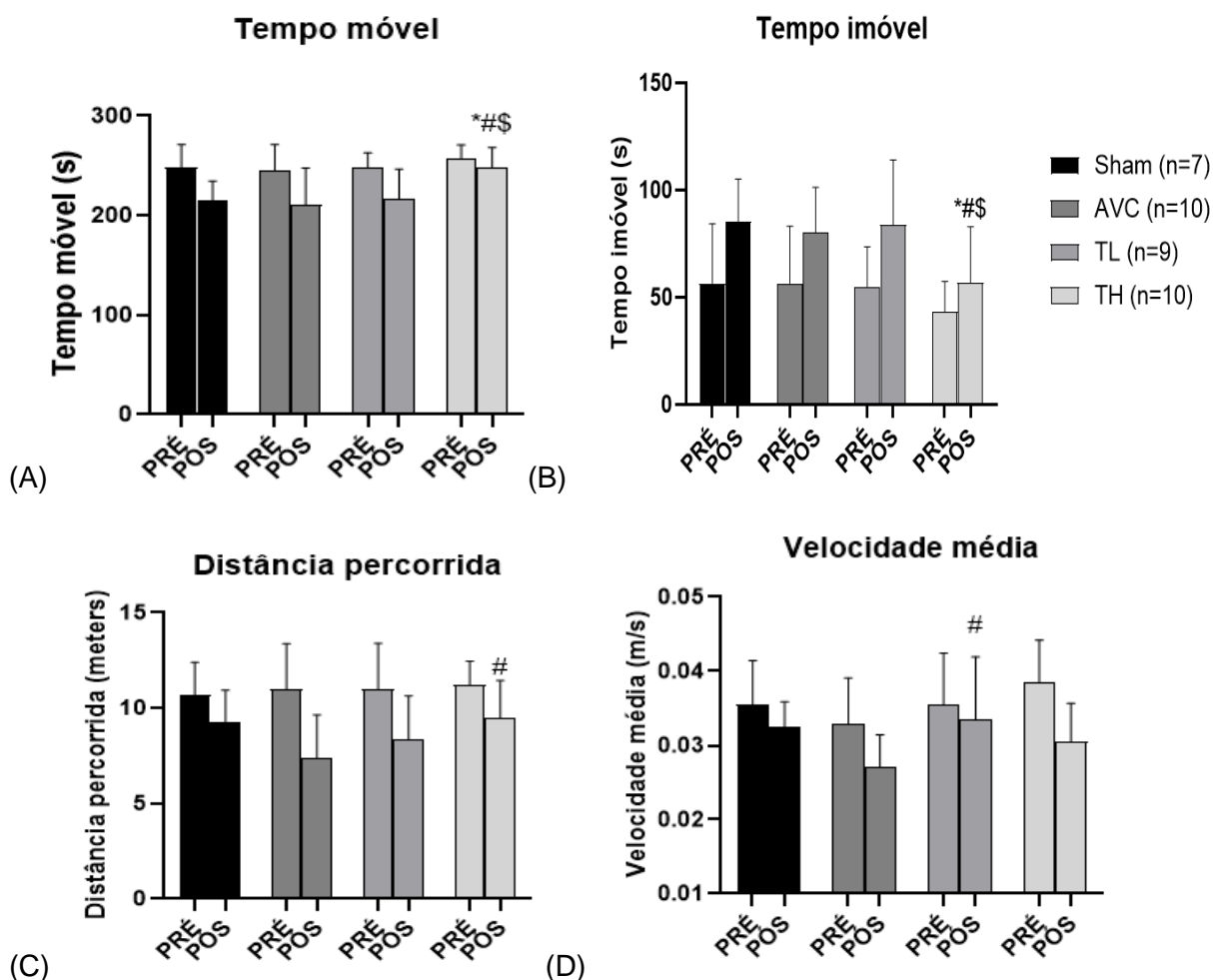


Figura 12: Resultado Campo aberto (A) Tempo Móvel: o gráfico ilustra que o grupo TH permaneceu significativamente mais tempo em movimento em comparação aos demais grupos. (B) Tempo Imóvel: o grupo TH apresentou um tempo imóvel significativamente menor em relação aos outros grupos, sugerindo maior atividade motora. (C) Distância Percorrida: o grupo TH percorreu uma distância significativamente maior do que o grupo AVC, indicando maior exploração do ambiente. (D) Velocidade Média: o grupo TL apresentou uma velocidade média significativamente maior que o grupo AVC, demonstrando uma melhora no desempenho motor. Os símbolos * vs Sham, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Fisher's. Expressos como média \pm EPM.

4.3 TESTE DE SUSPENSÃO DE FIO (WIRE HANG TEST) E FORÇA DE PREENSÃO (GRIP TEST)

No Gráfico A os dados referentes aos testes de força muscular utilizando o *Wire Hang* demonstraram que o grupo tratado com baixa dose de laser terapia sistêmica (TL)

apresentou uma recuperação significativamente superior à do grupo que sofreu isquemia sem tratamento (AVC) (AVC: 26,49 s \pm 5,79 s; TL: 47,44 s \pm 7,51 s e TH: 22,61 s \pm 7,37 s). Esses achados corroboram evidências da literatura que sugerem o papel modulador da fotobiomodulação na regeneração muscular. Em um estudo de Marcos et al. (2022), dos 24 ensaios analisados foi constatado que a FBM melhora a atividade muscular e acelera a recuperação algica (Luo, et al., 2021).

No teste wire-hang, a performance significativamente melhor do grupo TL está em consonância com os achados de Xuan et al. (2014), que demonstraram que a aplicação de laser terapia em modelos experimentais de traumatismo crânio encefálico promoveu a recuperação funcional, melhorou a força de preensão e o movimento.

Em contrapartida, os resultados do Gráfico B, referentes ao grip-teste, não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Essa ausência de efeito detectável pode estar relacionada à natureza do teste em questão, susceptível a alterações comportamentais do animal, ficando como pretensão futura aumentar o n, para confirmação dos resultados.

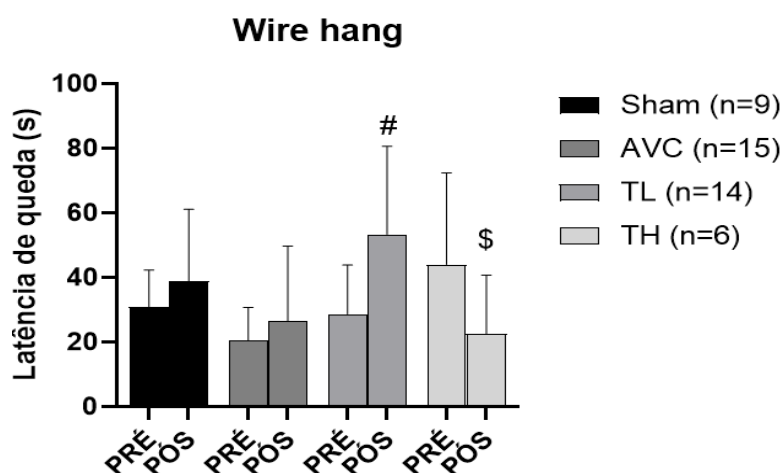


Figura 13: Resultados do teste *Wire-Hang*. Os gráficos mostram a performance significativamente melhor do grupo tratado com baixa dose de laser terapia sistêmica (TL) em comparação ao grupo AVC. # vs AVC e \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

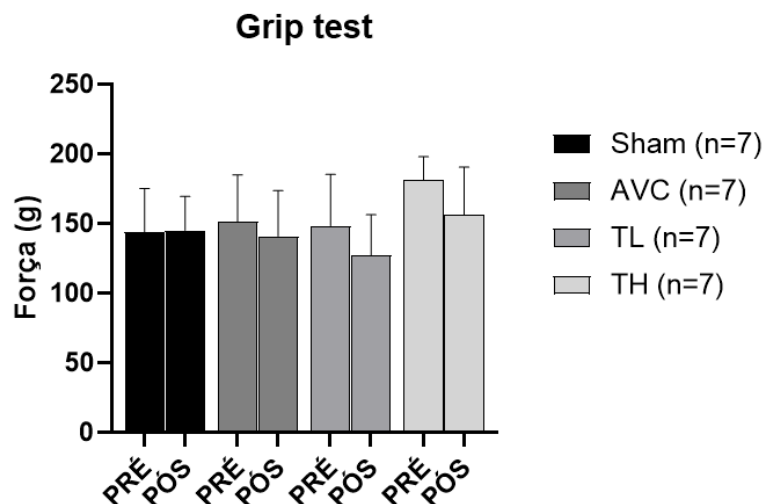


Figura 14: Resultados do grip-teste, onde não foi observada diferença significativa entre os grupos. Representam $p > 0,05$. Valores comparados com ANOVA duas vias, seguidos de *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

4.4 POLE TEST

De acordo com os estudos científicos, o *Pole Test* (ou teste da barra) é comumente empregado para analisar a habilidade motora e o equilíbrio em modelos animais (Crawley, et al., 2007 e Bellum, et al., 2007), principalmente em pesquisas de neurociência que abordam enfermidades neurodegenerativas, AVC ou lesões isquêmicas (Balkaya, et al., 2013). Foi constatada uma associação positiva entre a força muscular e o equilíbrio estático no membro inferior afetado com a velocidade da caminhada (Camerin, et al., 2021). Contudo, não foi observado, em nossos resultados, variação significativa entre o grupo AVC e o grupo *Sham*.

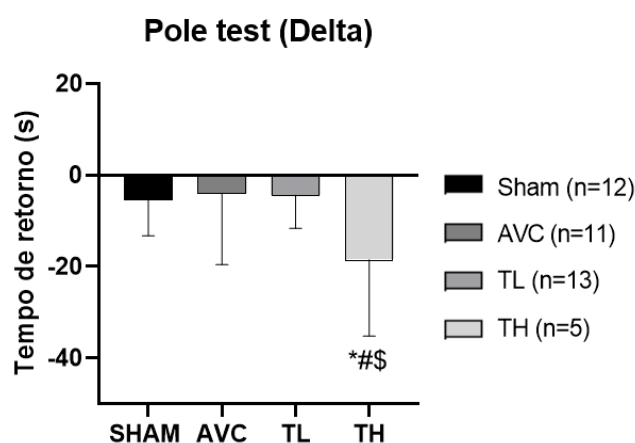


Figura 15: Resultado Pole test. O gráfico apresenta o delta, que indica a diferença no desempenho pré e pós-oclusão. O grupo TH mostrou uma recuperação significativamente superior em comparação aos grupos TL, AVC e *Sham*. Esses

dados sugerem que a alta dose de laser terapia sistêmica promove uma melhora expressiva na coordenação motora e equilíbrio, indicando um efeito neuroprotetor eficaz. Os símbolos * vs *Sham*, # vs AVC, \$ vs TL. representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

Os resultados do Pole test indicaram que o delta, que representa a diferença entre o desempenho antes e depois da oclusão bicarotídea, foi significativamente maior no grupo TH em comparação com os outros grupos, sendo que desempenho dos animais que foram tratados com alta dose de luz, foi 25,75% maior quando comparado aos demais que não foram tratados. Isso sugere que a alta dose de laser terapia sistêmica contribuiu de forma mais efetiva para a melhora das funções motoras e a recuperação do equilíbrio, quando comparada ao grupo TL, AVC e ao grupo *Sham* (*Sham*: 3,93 s \pm 5,26 s; AVC: -0,92 s \pm 5,48 s; TL: -0,76 s \pm 3,63 s e TH: 0,15 s \pm 5,45 s). Esses resultados corroboram com estudos em humanos. Por exemplo, um estudo prospectivo randomizado com 40 pacientes encontrou uma melhora no equilíbrio e nos parâmetros da marcha de pacientes que sofreram AVC e que receberam a LLLT (Huang, et al., 2022).

4.5 CBA

4.5.1. IL12-p70

Conforme a Figura 16 houve um aumento significativo dos níveis de IL-12P70 no grupo TL em comparação ao grupo AVC (AVC: 16,34 pg/mL \pm 0,79 pg/mL; TL: 19,31 pg/mL \pm 1,21 pg/mL e TH 15,77 pg/mL \pm 1,06 pg/mL). Esse resultado sugere que a aplicação de doses baixas de laser terapia sistêmica pode estimular uma maior resposta inflamatória no tecido cerebral em comparação ao grupo AVC. Além disso, quando os níveis de IL-12P70 do grupo TH foram comparados com os do grupo TL, foi constatada uma redução significativa, indicando que a alta dose de laser terapia pode refletir um efeito neuroimunomodulador significativo, possivelmente contribuindo para mecanismos de neuroproteção ou regeneração após o AVC. Bitencourt, 2020 observou uma associação negativa entre IL12P70 e a gravidade do AVC, e positiva com a força de preensão palmar do lado afetado.

Entretanto, no plasma houve um aumento significativo no grupo TH em comparação com os grupos *Sham*, AVC e TL (*Sham*: 13,86 pg/mL \pm 1,12 pg/mL; AVC: 15,52 pg/mL \pm 0,62 pg/mL; TL: 14,90 pg/mL \pm 1,06 pg/mL e TH: 18,33 pg/mL \pm 0,68 pg/mL). Esse

resultado destaca que a aplicação de altas doses de laser terapia sistêmica não só atua localmente, no tecido cerebral, mas também tem um efeito sistêmico, aumentando a concentração plasmática de IL-12P70. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por células dendríticas, macrófagos e células B em resposta a patógenos microbianos (Ma, & Trinchieri, 2001; O'Shea, & Paul, 2002).

A elevação da IL-12P70 pode estar associada a uma ativação mais robusta de células imunes, por estar envolvida na ativação de células T e células natural killer (NK) (Trinchieri, et al.,1995). A maior ativação de células imunes, de contrapartida, poderiam ser superexpressadas em razão da geração de espécies reativas de oxigênio ou mesmo de oxigênio singlete pelo processo de transferência de elétrons ou de energia. Estudos associam que níveis mais baixos da produção de IL-12 podem limitar gravemente a defesa do hospedeiro contra algumas infecções e, então, associar-se com taxas mais elevadas de mortalidade (Lauw, et al., 1999; Göebel, et al., 2000).

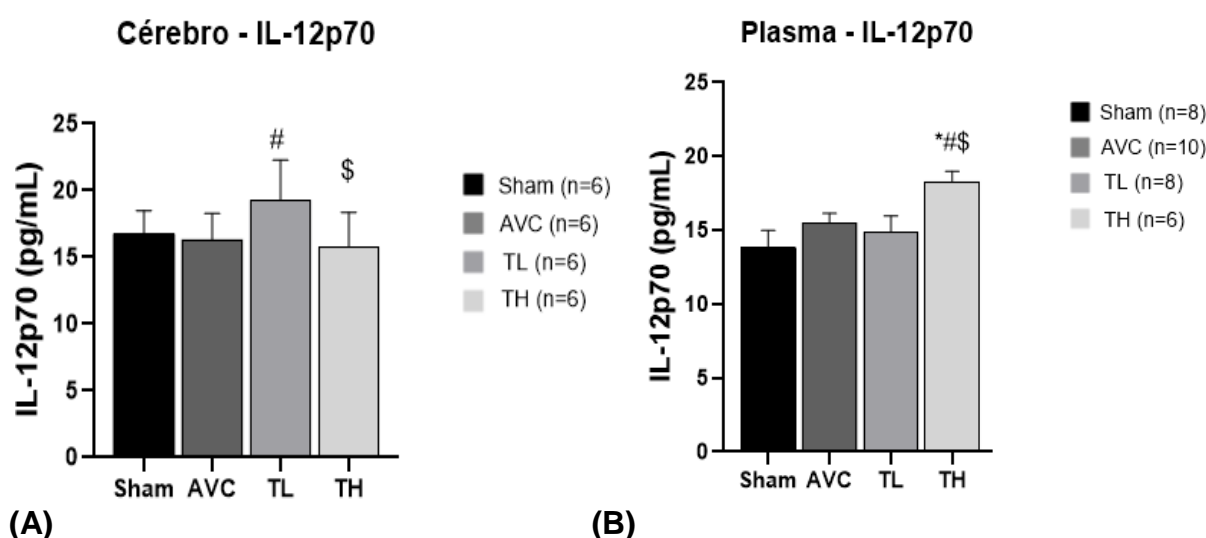


Figura 16: Dosagem de IL-12p70 (A). Observa-se um aumento significativo da IL-12p70 no grupo TL em comparação com o grupo AVC e uma diminuição no grupo TH em comparação ao grupo TL, sugerindo uma ativação dose-dependente da resposta inflamatória. **(B)** Níveis de IL-12p70 no plasma dos grupos experimentais. O TH apresentou um aumento significativo de IL-12p70 em comparação aos grupos Sham, (* $p < 0,05$), AVC (# $p < 0,05$) e TL (\$ $p < 0,05$). Esse aumento sugere uma resposta inflamatória sistêmica superior em doses elevadas de LLLT vascular, possivelmente refletindo uma amplificação da ativação imune. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de post hoc de Fisher, expressos como média \pm EPM.

Comparando esses resultados com estudo Martins, 2021, fica evidente que a laser terapia sistêmica possui o potencial de modular a concentração de IL-12p70, que,

neste estudo em questão, a dose salivar desta interleucina foi maior no grupo PBMT. Destaca-se a atuação desta na apresentação de antígenos e na imuno- estimulação (Ma, et al., 2015). Destaca-se também o possível mecanismo de ação da PBMT, o estímulo das células apresentadoras de antígenos-Receptor Toll-Like (TLR), a produzir IL-12p70, induzindo uma resposta imune mais eficaz contra agentes microbianos (Martins, et al., 2021).

4.5.2. TNF

Nos resultados obtidos para o Fator de Necrose Tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor - TNF), não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis dessa citocina inflamatória entre os diferentes grupos experimentais, tanto no cérebro quanto no plasma, sem variações que indicassem uma resposta diferenciada ao tratamento ou à condição patológica.

A ausência de alterações significativas nos níveis de TNF entre os grupos pode sugerir que essa citocina específica não tenha sido modulada pelas diferentes dosagens de laser terapia ou pela condição de AVC no modelo utilizado. O TNF é conhecido por desempenhar um papel central na resposta inflamatória aguda, porém, seu envolvimento pode ser mais expressivo em outras fases ou em outros contextos inflamatórios agudos e sistêmicos que não foram captados nos momentos da análise. Na literatura há, de qualquer forma, um conflito do TNF como marcador pós-AVC, já que, com base em Xue, et al., 2022, estudos anteriores demonstram que, em algumas condições, o TNF- α pode apresentar um padrão de resposta variável, dependendo do tipo de estímulo inflamatório e da fase de lesão tecidual. A falta de variação observada neste estudo sugere que, no contexto de lesão cerebral por AVC e da intervenção por laser terapia, o TNF- α não é um mediador-chave da resposta inflamatória em comparação com outras citocinas, como a IL-12P70, que mostrou alterações significativas.

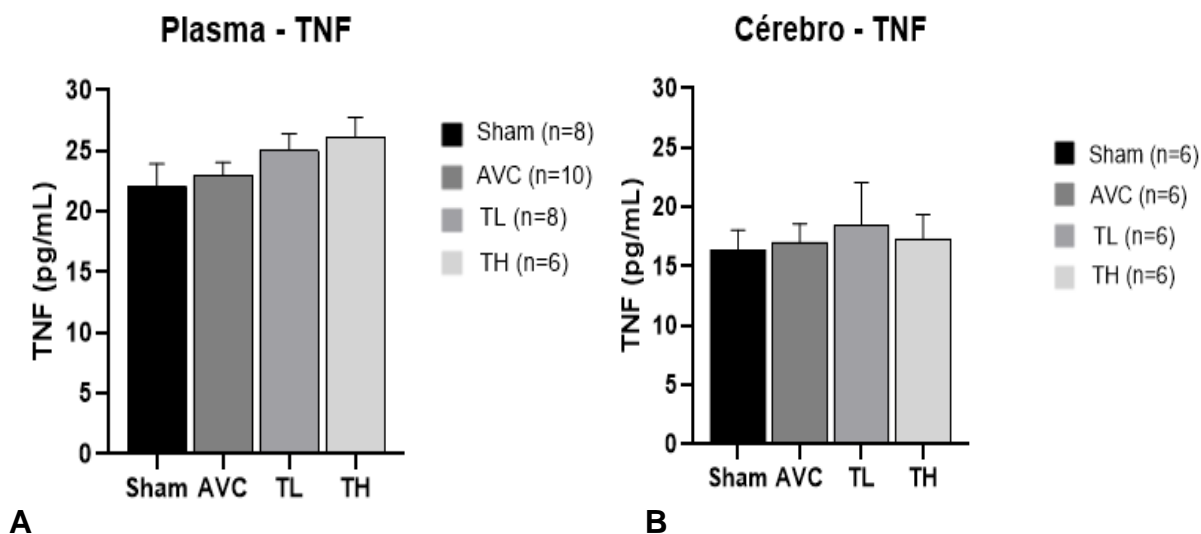


Figura 17: Dosagem de TNF. (A) No plasma, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$), sugerindo que o tratamento com laser terapia não modulou os níveis de TNF no tecido cerebral neste modelo experimental. (B) Níveis de TNF no cérebro sem alterações estatisticamente significativas entre os grupos TH, TL, AVC e *Sham* ($p > 0,05$), o que indica que a resposta inflamatória sistêmica, medida pelo TNF, não foi significativamente afetada pelas diferentes doses de laser terapia. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos do teste de Fisher, expressos como média \pm EPM.

O resultado encontrado contrapõe o estudo realizado por Souza, et al., 2018, que evidenciou nos seus resultados que o tratamento com PBM após lesão em tecido muscular, usando luz vermelha (660 nm), induziu redução da expressão de mRNA de TNF- α após 2 dias.

4.5.3. IFN- γ

Interferon- γ derivado de células T CD4⁺ e CD8⁺ (IFN- γ) é um mediador inflamatório, sendo considerado um regulador-chave das respostas imunes e inflamatórias (Yilmaz, et al., 2006). Há evidências que essa citocina contribui para gerar lesões após isquemia e reperfusão em outros órgãos (Horie, et al., 1999), a qual também foi encontrada no tecido cerebral de ratos após isquemia cerebral focal permanente (Li HL, et al., 2001). Contudo, como se pode observar no gráfico (A) da Figura 18, a dosagem do IFN- γ revelou que, no cérebro, não houve diferença estatística. O fato de não haver aumento significativo como resposta ao IL1B é positivamente relevante, uma vez que Yilmaz, (2006), evidenciou que os linfócitos T e o IFN- γ podem atuar na microvasculatura cerebral, acarretando um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombogênico,

Por outro lado, no plasma (B), os dados mostram que houve um aumento expressivo nos níveis plasmáticos de IFN- γ , estatisticamente significativo, entre o grupo TH e os grupos AVC e TL (AVC: 1,98 pg/mL \pm 0,05 pg/mL; TL: 1,90 pg/mL \pm 0,08 pg/mL e TH: 2,39 pg/mL \pm 0,20 pg/mL), o que sugere que a terapia com alta dose de laser terapia sistêmica foi eficaz em modular os níveis dessa citocina de maneira relevante no plasma. Apesar da ação pro-inflamatória no tecido, como mencionado, é plausível frisar que a infecção é a causa principal de mortalidade no pós-AVC isquêmico agudo, resultante de uma imunodepressão em resposta à diminuição de células T e NK circulantes, por consequência redução da citocina antibacteriana IFN- γ no período de reperfusão inicial. Logo, o aumento dessa citocina no plasma do grupo TH sugere um melhor cenário profilático de infecções sistêmicas, uma vez que o IFN- γ é considerado um regulador-chave das respostas imunes e inflamatórias (Yilmaz, et al., 2006).

Os resultados corroboram com o estudo de Dantas (2020), no qual também houve um aumento dos níveis de IFN- γ após tratamento de PBM e ainda um aumento dos níveis de mRNA do IFN- γ , acompanhado de redução das ROS.

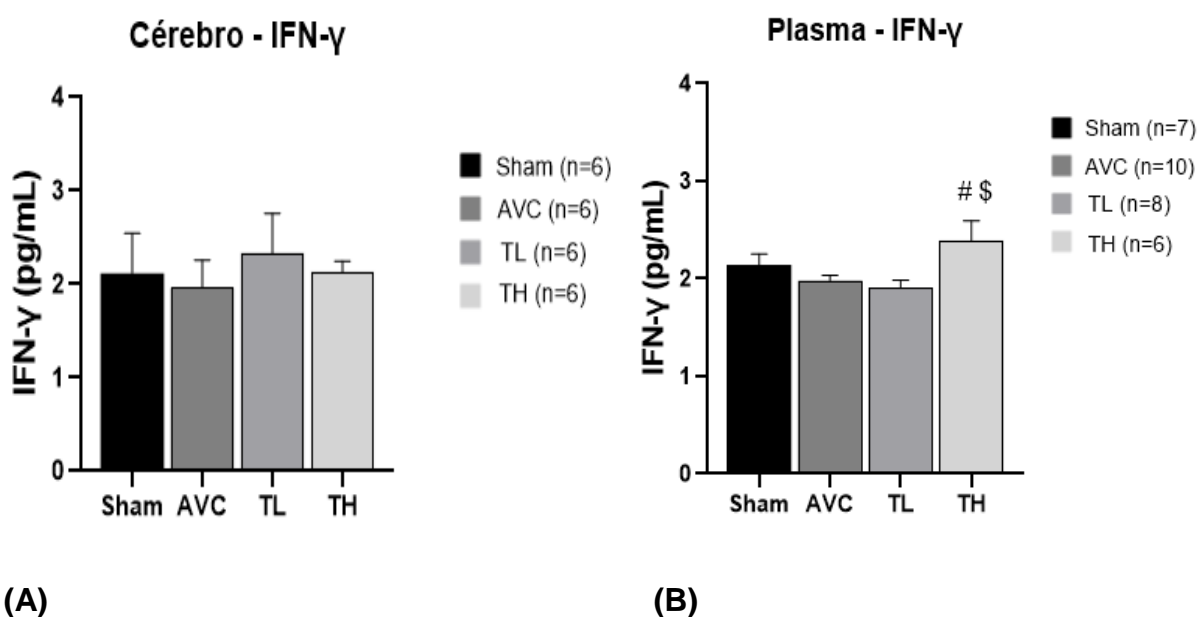


Figura 18: Dosagem de IFN- γ . (A) Níveis de IFN- γ no cérebro: observou-se um aumento no grupo TL, porém sem significância estatística ($p > 0,05$). (B) Níveis de IFN- γ no plasma: o grupo TH (tratado com alta dose de laser terapia sistêmica) apresentou aumento significativo em comparação aos grupos AVC e TL, nos quais os símbolos # vs AVC e \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

4.5.4. MCP-1

O resultado referente à dosagem de MCP1 (Proteína Quimiotática de Monócitos 1) indica um comportamento distinto entre o plasma e o cérebro no contexto dos grupos experimentais. No plasma, observou-se um aumento significativo de MCP-1 no grupo TH em comparação com os demais grupos (*Sham*: 49,22 pg/mL \pm 1,87 pg/mL; *AVC*: 51,29 pg/mL \pm 1,69 pg/mL; *TL*: 49,12 pg/mL \pm 1,60 pg/mL e *TH*: 58,40 pg/mL \pm 2,18 pg/mL). O aumento da MCP-1 em *AVC* já foi relatado na literatura (Reynolds, et al., 2003; Arakelyan, et al., 2005 e Buraczynska, et al., 2010). Essa quimiocina primária recruta monócitos para os locais do endotélio arterial lesionado, atuando na resposta inflamatória, tanto em fases inflamatórias agudas quanto crônicas (Buraczynska, et al., 2010). No *AVC*, o estudo de Li, et al., 2020, indica a contribuição da via de sinalização da quimiocina MCP-1 na progressão do *AVCI*.

No cérebro, também houve um aumento significativo de MCP-1 no grupo TH, mas a comparação revelou que esse aumento foi expressivamente superior quando comparado especificamente aos grupos *Sham* e *TL* (*Sham*: 48,67 pg/mL \pm 1,02 pg/mL; *AVC*: 50,96 pg/mL \pm 2,73 pg/mL; *TL*: 48,56 pg/mL \pm 1,44 pg/mL e *TH*: 55,65 pg/mL \pm 3,35 pg/mL). Esse perfil inflamatório sugere que o ILIB, especialmente na dose 6 J, pode ter efeitos marcantes, tanto na circulação periférica quanto no tecido cerebral, modulando a presença de proteínas relacionadas à inflamação, como a MCP-1.

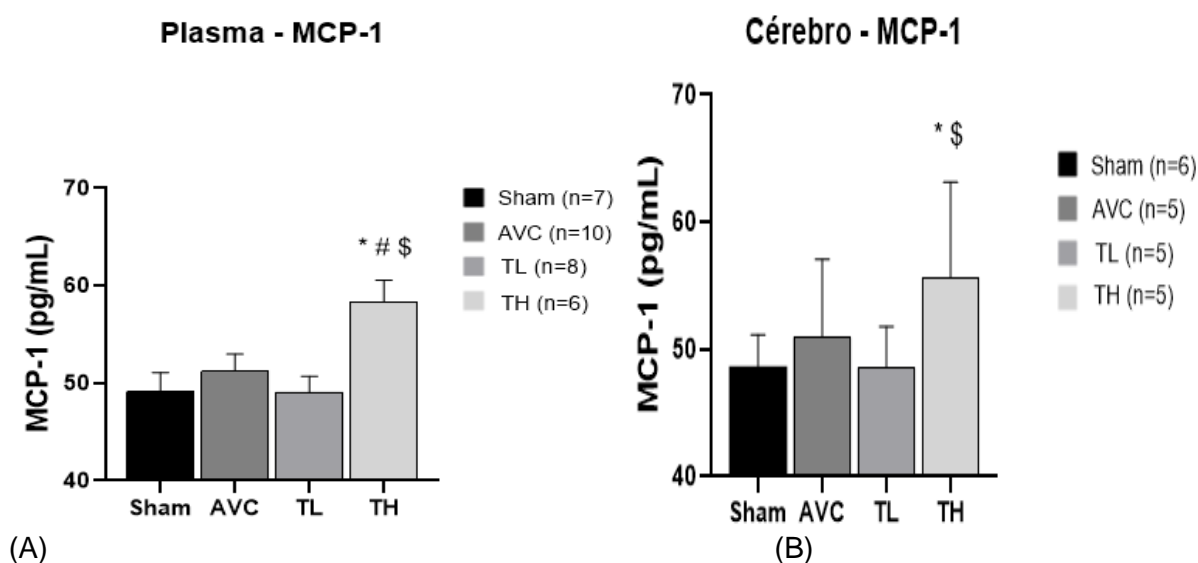


Figura 19: Dosagem de MCP-1. (A) Resultados revelam um aumento significativo da MCP-1 no plasma em relação aos demais grupos e no cérebro do grupo TH (B),

destacando sua influência na resposta inflamatória em comparação ao grupo *Sham* e TL. Esses achados indicam o potencial da laser terapia em modular respostas inflamatórias, tanto periféricas quanto cerebrais. Os símbolos * vs *Sham*, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

Com base nos resultados de Fukuda (2012), que de igual forma demonstram picos elevados de MCP1 nas primeiras 60 h, seguidos de uma modulação com redução da produção, torna-se evidente que a resposta inflamatória tem um comportamento dinâmico ao longo do tempo, em resposta à LLLT. Desta forma é necessário que futuros estudos avaliem essa terapia com um período de acompanhamento mais prolongado. Isso permitirá compreender melhor sua influência, não apenas nos picos iniciais de inflamação, mas também em como ela afeta a modulação e a resolução inflamatória em fases mais tardias da recuperação pós-AVC.

4.5.5. IL-10

Os resultados da dosagem de interleucina 10 (IL-10) revelaram um comportamento distinto entre as amostras de plasma e cérebro. No plasma, observou-se um aumento significativo nos níveis de IL-10 no grupo TH em comparação com os demais grupos, (*Sham*: 18,99 pg/mL \pm 0,46 pg/mL; AVC: 19,22 pg/mL \pm 0,74 pg/mL; TL: 20,07 pg/mL \pm 1,12 pg/mL e TH: 22,52 pg/mL \pm 0,59 pg/mL) sugerindo uma resposta anti-inflamatória aumentada neste grupo, corroborando com o estudo de Silveira (2016), que descreveu um aumento da IL-10 com o uso da LLLT após lesão muscular traumática aguda. Níveis séricos de IL-10 aumentados estão relacionados a melhores prognósticos após o AVC, como visto no estudo de Protti (2013), que mostrou que essa interleucina tem ação protetora na fase aguda do AVC e níveis mais baixos, que, segundo Vila (2003), correlaciona a piora neurológica no AVE agudo.

Por outro lado, no tecido cerebral, os níveis de IL-10 foram reduzidos no grupo TH em comparação com o grupo *Sham*, e essa redução foi ainda mais acentuada no grupo AVC em relação ao *Sham* (*Sham*: 24,27 pg/mL \pm 1,08 pg/mL; AVC: 19,93 pg/mL \pm 1,09 pg/mL; TL: 22,54 pg/mL \pm 0,98 pg/mL; TH: 21,34 pg/mL \pm 0,36 pg/mL). Esses achados indicam uma possível modulação diferenciada da IL-10 nos compartimentos plasmático e cerebral após o tratamento com laser terapia. Oliveira (2013) também encontrou uma redução da IL-10 em linfonodos mesentéricos e periaórticos.

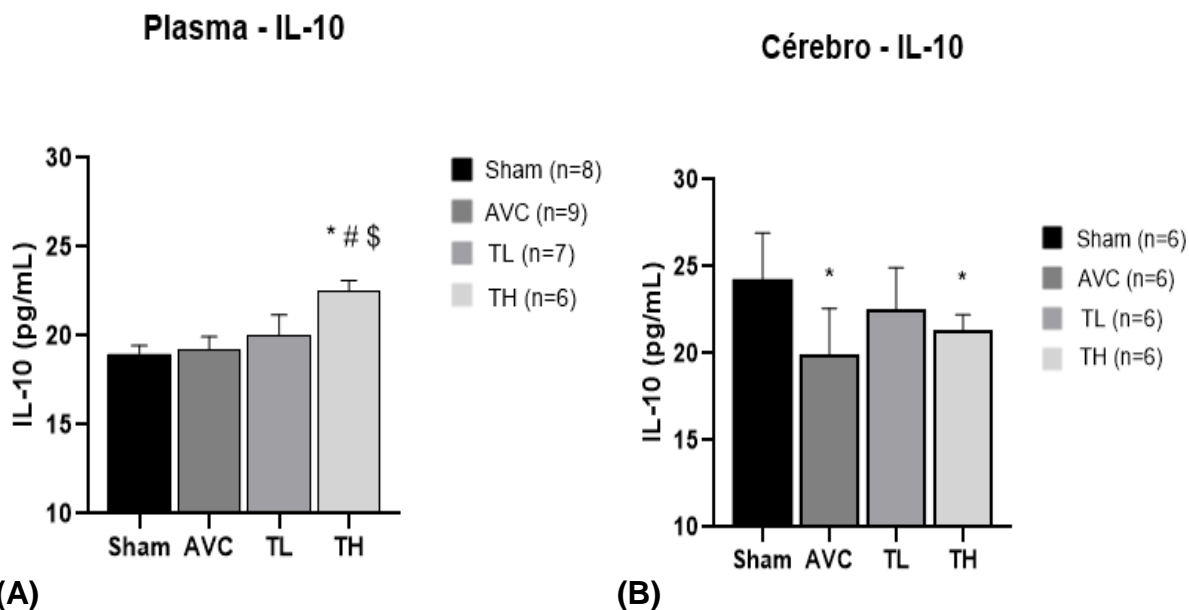


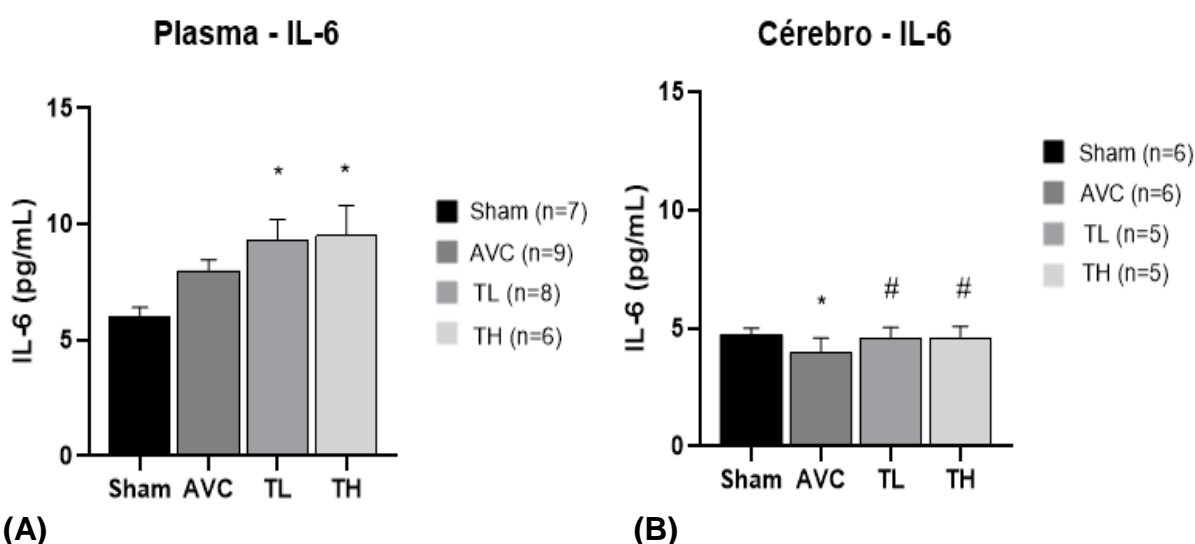
Figura 20: Dosagem de IL-10. (A) No plasma, o grupo TH apresentou um aumento significativo de IL-10 em comparação aos demais grupos. (B) No cérebro, os níveis de IL-10 foram reduzidos no grupo TH em relação ao grupo *Sham*, com uma redução ainda maior observada no grupo AVC. Esses resultados sugerem uma modulação distinta da resposta anti-inflamatória nos diferentes tecidos após a intervenção com laser terapia. Os símbolos * vs *Sham*, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de post hoc de Fisher, expressos como média \pm EPM.

4.5.6. IL-6

A Interleucina 6 (IL-6) é considerada uma citocina pró-inflamatória (Ramadori, et al., 1999; Ulich, et al., 1989 e Johnson, et al., 1998), podendo ser associada a uma ação inflamatória precoce cerebral e vascular, correlacionada ao maior volume de infarto cerebral e gravidades do AVC (Smith, et al., 2004). Contudo, há um grande conflito na literatura, pois estudos também mostram efeitos positivos neurotróficos (Gruol, et al., 1997) e anti-inflamatórios (Schindler, et al., 1990), que também pode ser significativo após lesão cerebral.

Nos resultados referentes IL-6, o presente estudo constatou um aumento significativo nos níveis plasmáticos dessa citocina nos grupos tratados com laser terapia sistêmica, tanto no grupo TL quanto no grupo TH, quando comparados ao grupo *Sham* (*Sham*: 6,04 pg/mL \pm 0,38 pg/mL; TL: 9,36 pg/mL \pm 0,85 pg/mL e TH: 9,53 pg/mL \pm 1,27 pg/mL). Isso indica que, independentemente da dosagem aplicada, a laser terapia foi capaz de aumentar a produção de IL-6 no plasma.

Além disso, ao analisar os níveis de IL-6 no tecido cerebral, verificou-se que o grupo AVC apresentou níveis mais baixos de IL-6 em comparação ao grupo *Sham*. Entretanto, tanto o grupo TL quanto o grupo TH exibiram níveis significativamente maiores de IL-6 em relação ao grupo AVC, (*Sham*: 4,73 pg/mL \pm 0,11 pg/mL; AVC: 3,97 pg/mL \pm 0,25 pg/mL; TL: 5,46 pg/mL \pm 0,86 pg/mL e TH: 5,15 pg/mL \pm 0,55 pg/mL), sugerindo que a laser terapia sistêmica, em ambas as dosagens, promoveu um aumento da produção de IL-6 no cérebro. Curiosamente, o grupo *Sham*, que não sofreu infarto, apresentou níveis mais elevados de IL-6 no cérebro quando comparado ao grupo AVC. Tian (2023), em exposições dos macrófagos a irradiações do laser sob diferentes parâmetros, encontrou que o quantitativo da IL-6 em resposta a LLLT é dose-dependente, ou seja, dependendo da dose de irradiação utilizada, pode haver aumento ou redução da IL-6.



(A) **(B)**
Figura 21: Dosagem da IL-6 entre os diferentes grupos experimentais. (A) No plasma, houve um aumento significativo de IL-6 nos grupos TL e TH em comparação ao grupo *Sham*. (B) No cérebro, os níveis de IL-6 foram maiores no grupo AVC em relação ao grupo *Sham*, enquanto os grupos tratados com laser (TL e TH) apresentaram aumentos ainda mais significativos de IL-6 em comparação ao grupo AVC. Esses resultados indicam que a laser terapia sistêmica aumenta a produção de IL-6 tanto no plasma quanto no cérebro. Os símbolos * vs *Sham*. e # vs AVC. representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, seguidos de post hoc de Fisher, expressos como média \pm EPM.

Esses achados indicam uma possível modulação inflamatória diferencial induzida pela laser terapia sistêmica, tanto no plasma quanto no cérebro, com influência sobre a produção de IL-6 em diferentes contextos de inflamação e lesão tecidual. Contudo o estudo de Mojarad (2017), comparou a concentração de interleucina-6 (IL-6) em animais submetidos à laser terapia por uma e duas semanas, demonstrando uma

redução significativa da IL-6, com uma maior redução ao longo de duas semanas, indicando um efeito modulador mais eficaz a longo prazo. A diminuição dos níveis de IL-6 após duas semanas de laser foi semelhante à observada no grupo que recebeu metilprednisolona sódica (Mojarad, et al., 2017).

4.6 HEMOGRAMA COMPLETO

4.6.1. Série branca

A dosagem de neutrófilos segmentados mostrou que houve um aumento significativo no grupo TH em comparação aos outros grupos, apresentando um aumento de 4,8 vezes em relação ao Sham, 3,1 vezes em relação ao AVC, e 2,0 vezes em relação ao TL. E no Grupo TL em comparação aos Grupos AVC e *Sham*, sugerindo que o tratamento com diferentes doses de laser terapia teve impacto nos níveis de neutrófilos segmentados, conforme a Tabela 02. Em contrapartida, Gomes (2021) encontrou o mesmo resultado no grupo tratado com LLLT com relação ao controle. Diferentemente dos neutrófilos segmentados, os bastonetes não foram observados diferença significativa entre as dosagens dos grupos.

Os neutrófilos desempenham funções complexas no contexto do AVCI, sendo uma das primeiras células sanguíneas a migrar para o cérebro após o AVC em um modelo de obstrução permanente da artéria cerebral média (Kim, et al., 2019; Perez, et al., 2015, Essig, et al., 2020). Estudos mostram que os neutrófilos estão relacionados a desfechos funcionais clinicamente desfavoráveis (Harris, et al., 2005; Frieler, et al., 2017; Kawano, et al., 2019; Hou, et al., 2019). No entanto, também há evidências de que eles possam ter um papel protetor durante o AVC isquêmico. Por outro lado, uma intervenção que visava bloquear a migração dos neutrófilos para o cérebro não demonstrou benefícios clínicos significativos após o AVC isquêmico (Elkind, et al., 2017 e 2020).

Observou-se que os monócitos não apresentaram diferença significativa entre os grupos, podendo ser cogitado o período de análise de 48 h pós-AVC, contudo, os estudos refletem que a infiltração de monócitos atinge o pico três dias após o AVC, (Wattananit, et al., 2016). Outra evidencia é que os resultados da contribuição dos macrófagos infiltrantes para danos neurológicos não são unânimes (DeLong, et al., 2022), uma vez que, desempenham um papel crucial na imunidade inata vascular e

têm a capacidade de gerar elevadas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Dutta & Nahrendorf, 2015).

Leucócitos totais tiveram uma redução significativa no grupo TH em comparação ao Grupo *Sham*, indicando uma alteração relevante no número de leucócitos neste grupo tratado com alta dose de laser terapia sistêmica, mas não nos demais grupos que de igual forma sofreram isquemia. Os leucócitos estão associados na literatura a trombos de AVC, contudo, também participa da defesa sistêmica pós AVC; logo a sua concentração deve apresentar uma homeostase (Bi, et al. 2021)

O Grupo *Sham* apresentou um aumento dos eosinófilos significativo em relação aos grupos AVC, TL e TH, indicando que o tratamento, ou sua ausência, impactou os níveis de eosinófilos. O mesmo achado se repetiu com os níveis de plaquetas e o MPV, entretanto, a literatura mostra que o LLLT aumenta o número de plaquetas geradas a partir de megacariócitos (Zhang, et al., 2016), ou seja, nestes parâmetros não ficou evidenciada a modulação do laser intravascular.

Guo (2015) analisou a contagem de leucócitos em pacientes com AVC, argumentando que a diminuição dos eosinófilos poderia estar relacionada a dois mecanismos principais: apoptose ou migração dessas células para o tecido cerebral (Davoine, et al., 2014). Durante o AVC, ocorre a quebra da barreira hematoencefálica (BHE), permitindo a infiltração de células inflamatórias, incluindo eosinófilos, no tecido cerebral lesado (Shichita, et al., 2012).

O grupo TH reduziu significativa os níveis de linfócitos típicos e basófilos em relação aos demais grupos. Entretanto na Razão Neutrófilo/Linfócito (RNL) houve um aumento significativo do TH, ao comparar com aos outros grupos. Esse resultado também foi descrito em estudo com camundongos portadores de câncer de mama que receberam a FBM (Silva, et al., 2021). Ressalta-se, que a RNL é considerada um biomarcador de prognósticos preciso em casos de AVCI agudo (Sharma, et al., 2021).

Apesar deste aumento da RNL, observada no TH, indicar uma modulação inflamatória com maior atividade de neutrófilos, células do sistema imunológico inato, sendo um resultado preocupante de acordo com o estudo de Tokgoz et al. 2014, que demonstrou a RNL elevada (>4.81) no momento da admissão hospitalar pode ser preditor de mortalidade a curto prazo (dentro de 30 dias), independente do volume do infarto em

pacientes com AVC isquêmico agudo. Porém, simultaneamente, houve redução de linfócitos típicos, sugerindo um efeito regulador do laser terapia na resposta adaptativa, e de basófilos, possivelmente relacionado à diminuição de processos inflamatórios mediados por essas células. Esses achados apontam para um impacto do laser na promoção de um equilíbrio inflamatório favorável à recuperação sistêmica.

	Grupos (milhares/mm ³)				
	Sham	AVC	TL	TH	
Leucócitos	2,4±0,2	1,6±0,3	2,5±0,5	1,9±0,2	*
Neutrófilos Bastonetes	1,9±0,3	1,7±0,3	1,7±0,2	1,9±0,2	
Neutrófilos Segmentados	12,5±2,0	19,7±8,8	33,0±10,5	60,5±10,4	*# \$
Eosinófilos	1,9±0,4	0,5±0,1	1,1±0,7	0±0,00	*
Basófilos	12,3±2,4	14,0±5,0	16,2±4,1	0,9±0,2	*# \$
Linfócitos típicos	70,0±3,5	67,6±3,6	47,1±9,5	35,1±10,3	*# \$
Monócitos	1,2±0,2	1,4±0,3	0,9±0,4	1,3±0,3	
Razão Neutrófilos/Linfócitos (NLR)	0,2±0,04	1,7±1,7	2,1±0,9	9,8±2,8	*# \$
Plaquetas	1095,8±90,1	832,2±63,6	770,3±142,3	760,0±91,8	
M.P.V.	8,7±0,2	6,8±0,2	7,3±0,5	6,7±0,1	

Tabela 2: Contagens da série branca sanguínea.

ANOVA uma via e *post hoc* Fisher. Valores expressos como média ± EPM.

* vs Sham (n=9), # vs AVC (n=10) e \$ vs TL (n=10); TH (n=10).

Cor cinza: resultados que não tiveram diferença significativa.

Vermeij, et al. 2018, evidencia que a infecção é uma complicação comum após AVC, afetando de 15% a 30% dos pacientes, logo os resultados, positivos, da análise da série branca nos quais o ILIB, especialmente na dose de 6 J, promoveu alterações significativas em diversos parâmetros imunológicos, como os níveis de neutrófilos segmentados, leucócitos totais, linfócitos típicos e basófilos, sugerem um impacto direto na resposta inflamatória e imunológica após o AVC.

O aumento da RNL no grupo TH reforça a relevância dessa terapia como modulador de biomarcadores inflamatórios no contexto de AVCI. No entanto, a ausência de modulação significativa em outros parâmetros, como eosinófilos e plaquetas, ressalta a complexidade das respostas biológicas ao tratamento, exigindo investigações adicionais para esclarecer plenamente os efeitos da laser terapia sobre as células inflamatórias e o prognóstico pós-AVC.

4.6.2. Série vermelha

Os resultados da série vermelha do hemograma revelaram alterações significativas entre os diferentes grupos experimentais. Observou-se um aumento significativo no número de hemácias no grupo TH em comparação ao grupo *Sham* e AVC, indicando um efeito positivo da terapia sobre a produção de glóbulos vermelhos. Seguindo o mesmo padrão, o grupo TH apresentou níveis de hemoglobina significativamente mais altos do que o grupo *Sham*, sugerindo uma melhora na capacidade de transporte de oxigênio no grupo tratado. Ressalta-se que uma contagem baixa de eritrócitos pode comprometer a oxigenação do tecido cerebral, agravando a lesão (Tanne, et al., 2010). A literatura destaca a relação significativa entre os níveis baixo de hemoglobina, contagens de eritrócitos e os desfechos clínicos em pacientes pós-AVC com anemia, associando a piores desfechos, incluindo taxas de mortalidade mais altas e uma recuperação funcional mais prejudicada (Desai, et al., 2023). A relação entre os níveis de hemoglobina e os desfechos do AVC é não linear, tanto com níveis baixos quanto altos, aumentando o risco de mortalidade (Tanne, et al., 2010).

Não houve diferença significativa nos níveis de hematócrito entre os grupos, o que indica que o volume percentual de glóbulos vermelhos em relação ao volume sanguíneo total permaneceu estável, independentemente do tratamento. Contudo, o VCM (Volume Corpuscular Médio) apresentou uma redução significativa no grupo TH em comparação aos grupos *Sham* e AVC. E o TL também mostrou uma redução significativa desses valores em relação ao grupo *Sham*, mostrando o impacto da FBM no tamanho das hemácias.

HCM (Hemoglobina Corpuscular Média): o grupo TL apresentou um aumento significativo nos níveis de HCM em comparação ao grupo TH, indicando uma maior quantidade de hemoglobina por célula no grupo tratado com baixa dose de laser. Em contrapartida, houve um aumento de CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) no TH em comparação aos grupos *Sham* e AVC, e no TL em relação ao grupo *Sham*.

RDW (Red Cell Distribution Width) ou seja, amplitude de distribuição dos eritrócitos: este índice foi associado a resultados adversos em pacientes com o primeiro AVC, além disso, níveis mais altos de RDW foram associados a um risco aumentado de

AVCI recorrente (Shen, et al. 2023). Como mostra Tabela 03, o grupo TL apresentou valores significativamente menores de RDW (CV), mesmo em comparação ao *Sham*. A melhora das propriedades reológicas dos eritrócitos, especialmente em relação à agregação e deformabilidade, é crucial para o fluxo sanguíneo eficiente. A laser terapia tem demonstrado benefícios nesse contexto, pois aumenta a flexibilidade dos eritrócitos e reduz sua tendência à agregação, melhorando assim a circulação (Wang, et al. 2016). A diminuição do RDW nos animais que receberam laser sugere uma redução na variabilidade do tamanho das células, refletindo em uma melhora na homogeneidade e na deformabilidade dos eritrócitos, contribuindo para uma dinâmica reológica mais saudável, promovendo um fluxo sanguíneo (Wang, et al. 2016).

	Grupos			
	<i>Sham</i>	AVC	TL	TH
Hemácias (milhões/mm ³)	7,2 ± 0,3	7,6 ± 0,2	7,4 ± 0,5	8,1 ± 0,3 *#
Hemoglobina g/dL	11,4 ± 0,4	11,9 ± 0,3	11,7 ± 0,7	12,5 ± 0,4 *#
Hematócrito %	38,5 ± 1,3	39,5 ± 1,1	36,7 ± 2,8	37,1 ± 1,7
VCM. fL	53,5 ± 0,7	51,9 ± 1,3	49,2 ± 1,7 *	46,2 ± 1,9 *#
HCM. Pg	15,8 ± 0,1	15,6 ± 0,2	15,9 ± 0,2	15,5 ± 0,2 \$
CHCM. g/dl	29,5 ± 0,4	30,2 ± 0,5	32,6 ± 1,4 *	34,0 ± 1,4 *#
RDW (CV) %	20,9 ± 0,8	18,8 ± 0,8 *	19,2 ± 1,1 *	21,1 ± 0,8
RDW (SD) fL	33,1 ± 0,8	29,5 ± 1,8 *	26,1 ± 1,5 *	30,1 ± 0,9 *

Tabela 3: Contagens da série vermelha.

ANOVA uma via e *post hoc* Fisher. Valores expressos como média ± EPM.

* vs *Sham* (n=12), # vs AVC (n=14) e \$ vs TL (n=12); TH (n=11).

Cor cinza: resultados que não tiveram diferença significativa.

Esses achados indicam que a laser terapia sistêmica resultou em um aumento na produção de hemácias e hemoglobina, com redução no tamanho, favorecendo a ampliação da eficiência no tratamento das sequelas do AVC, melhorando a capacidade oxigenação sanguínea e por consequência cerebral.

4.7 ESTRESSE OXIDATIVO

4.7.1. AOPP

Os marcadores de estresse oxidativo, como AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) e TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), têm sido amplamente estudados em relação ao AVC, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes humanos (Toloue et al., 2016).

Durante o período de isquemia e reperfusão, há um acúmulo de ROS, o que resulta em maior oxidação proteica. E, por consequência, o aumento dos AOPP no plasma está associado à gravidade do AVC e pode servir como um indicador de dano oxidativo sistêmico (Maes, et al., 2023). Foi observada diferença significativa nos níveis de AOPP no plasma entre os grupos. Isso indica que, a nível sistêmico, a terapia com laser sistêmico apresentou impacto notável nos produtos de oxidação proteica no plasma após o AVC.

Estudos indicam que níveis elevados de AOPP após o AVC podem estar relacionados a pior desfecho neurológico, sugerindo que altos níveis de estresse oxidativo proteico contribuem para a extensão da lesão cerebral. O AOPP no tecido cerebral, mostrou que o TH apresentou uma redução significativa nos níveis de AOPP em comparação com os grupos. Esse achado é indicativo de um efeito neuroprotetor do ILIB, capaz de reduzir os danos oxidativos locais no cérebro pós-AVC. A menor concentração de produtos de oxidação proteica sugere que o tratamento pode atenuar os processos de estresse oxidativo associados à lesão isquêmica cerebral.

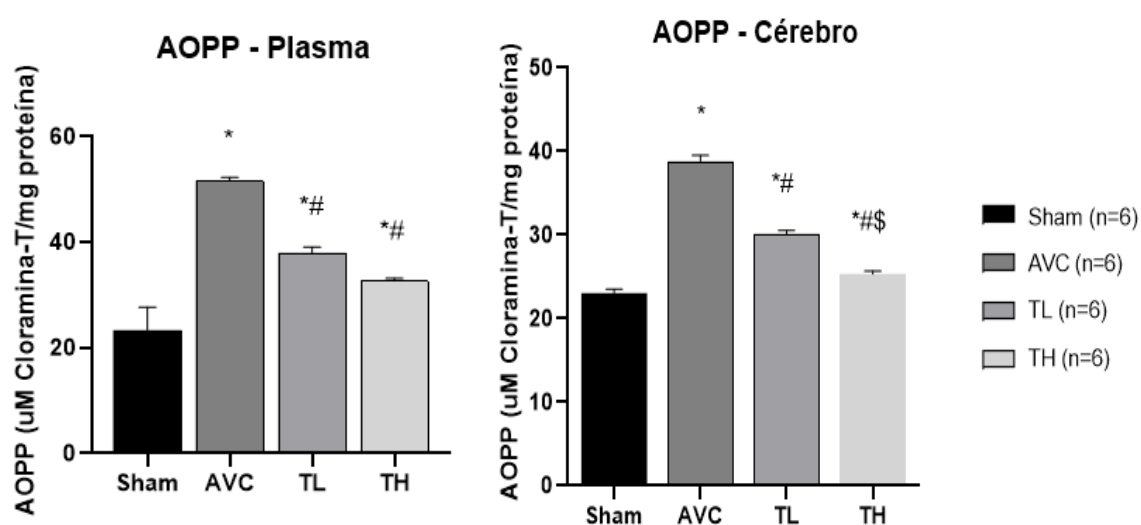


Figura 22: Estresse oxidativo: AOPP plasma e cérebro.

Sham, AVC, TH e TL, n=6 por grupo. Os símbolos * vs Sham, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

4.7.2. TBARS

A análise dos níveis de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), a medição de TBARS é uma forma indireta de avaliar o dano oxidativo a lipídeos.

Entretanto, os dados disponíveis mostram que os níveis de TBARS no grupo TH reduziram significativamente, com relação aos grupos AVC e TL. Isso reforça a ideia de que o ILIB exerce um papel importante ao reduzir a peroxidação lipídica no cérebro e no plasma após o AVC, indicando uma proteção contra o estresse oxidativo. Níveis elevados de TBARS estão associados à extensão da lesão isquêmica e à gravidade da peroxidação lipídica. Estudos sugerem que altos níveis de TBARS correlacionam-se com maiores áreas de infarto cerebral, maior comprometimento cognitivo e pior recuperação funcional.

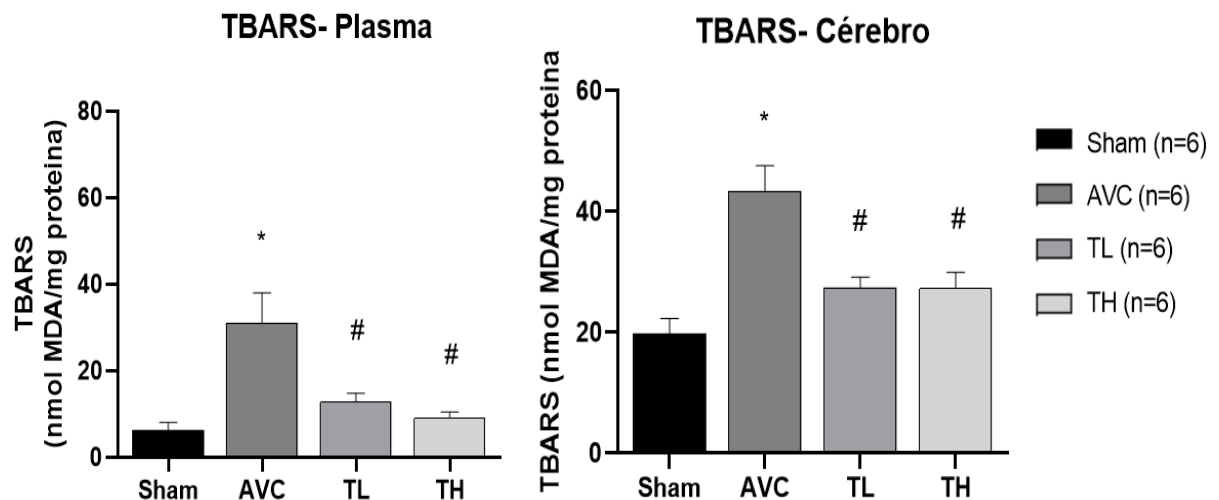


Figura 23: Estresse oxidativo: TBARS no plasma e cérebro. Sham, AVC, TH e TL, n=6 por grupo. Nos quais os símbolos * vs Sham, # vs AVC, \$ vs TL, representam $p < 0,05$. Valores comparados com ANOVA uma via, *post hoc* de Fisher, expressos como média \pm EPM.

Durante e após um AVC, há um aumento na produção de ROS, levando à maior peroxidação de lipídios nas membranas celulares. Esse aumento é particularmente notável no cérebro, onde o tecido é mais suscetível a danos por estresse oxidativo. Os níveis de TBARS tendem a aumentar significativamente tanto no cérebro quanto no plasma após um AVC, especialmente em fases agudas.

5 CONCLUSÕES

A avaliação dos dados desta pesquisa, revelou avanços significativos em parâmetros hemodinâmicos e funcionais, na fase aguda pós-AVCI. A aplicação de ILIB resultou em um aumento significativo na produção de interleucinas, como IL-12p70, IL-6, IL-10, MCP-1 e IFN- γ . O por exemplo do IFN- γ no plasma do grupo TH sugere um melhor cenário profilático de infecções sistêmicas, uma vez que essa citocina é considerado um regulador-chave das respostas imunes e inflamatórias. Esses efeitos mostraram-se dependentes da dose, com diferenças notáveis entre as proporções observadas no cérebro e no plasma. Além do efeito imunológico, o tratamento com ILIB apresentou vantagens funcionais, aprimorando a habilidade motora, a força e a mobilidade dos camundongos, evidenciado pelo aumento do tempo de atividade e da velocidade de deslocamento, assim como pela diminuição do tempo de inatividade. Ademais, o tratamento resultou em uma redução significativa da área macroscópica do infarto, e do estresse oxidativo cerebral e sanguíneo, tanto da oxidação proteica, quanto da peroxidação lipídica. Destacando o potencial terapêutico da ILIB na modulação da resposta inflamatória e na facilitação da reabilitação após eventos isquêmicos. Esses resultados não apenas confirmam a eficácia da laser terapia como uma abordagem inovadora, mas também abrem novas possibilidades para estratégias no tratamento do AVC.

6 PERSPECTIVAS

Outras análises deverão ser realizadas para um melhor entendimento da via sistêmicas, em diferentes regiões de aplicação, envolvendo os efeitos da fotobioestimulação após o AVC e seus mecanismos moleculares envolvidos. Além disso, ampliar a pesquisa em diferentes dosagens e protocolos de tratamento e analisar a resposta terapêutica, aumentando a aplicabilidade clínica, com outras comorbidades associadas ao AVC. A pesquisa também pode se expandir para ensaios clínicos em humanos, possibilitando a validação dos resultados e a formulação de diretrizes de tratamento fundamentadas em evidências.

REFERÊNCIAS

1. Adams, HP. Et al. Classification of subtypes of acute ischemic stroke. *Stroke*, Volume 46, Issue 5May 2015 Pages e114-e117 <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007773>.
2. Amjadi A, Mirmiranpour H, Sobhani SO, Moazami Goudarzi N (2019) Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT, PON1, catalase, and FRAP in diabetic rats. *Lasers Med Sci* 35:131–138. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02805>
3. Anders, JJ.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and laser surgery*, v. 33, n. 4, p. 183-184, 2015. (<https://doi.org/10.1089/pho.2015.9848>).
4. Arakelyan A, Petrkova J, Hermanova Z, Boyajyan A, Lukl J, Petrek M. Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. *Mediators Inflamm*. 2005 Aug 14;2005(3):175-9. doi: 10.1155/MI.2005.175. PMID: 16106105; PMCID: PMC1526470.
5. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. O papel da inflamação e das citocinas na lesão cerebral. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996; 20 (3):445–452.
6. Bailey EL, Smith C, Sudlow CL, Wardlaw JM. Pathology of lacunar ischemic stroke in humans--a systematic review. *Brain Pathol*. 2012 Sep;22(5):583-91. doi: 10.1111/j.1750-3639.2012.00575.x. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22329603; PMCID: PMC8057646.
7. Balkaya M, Kröber JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013 Mar;33(3):330-8. doi: 10.1038/jcbfm.2012.185. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23232947; PMCID: PMC3587814.
8. Balch MHH, Nimjee SM, Rink C, Hannawi Y. Beyond the Brain: The Systemic Pathophysiological Response to Acute Ischemic Stroke. *J Stroke*. 2020 May;22(2):159-172. doi: 10.5853/jos.2019.02978. Epub 2020 May 31. Erratum in: *J Stroke*. 2020 Sep;22(3):424. doi: 10.5853/jos.2019.02978.e1. PMID: 32635682; PMCID: PMC7341014.
9. Barbosa R, Marcolino A, Souza V, Bertolino G, Fonseca M, Guirro R. Effect of Low-Level Laser Therapy and Strength Training Protocol on Hand Grip by

- Dynamometry. *J Lasers Med Sci.* 2017 Summer;8(3):112-117. doi: 10.15171/jlms.2017.20. Epub 2017 Jun 27. PMID: 29123629; PMCID: PMC5662498.
10. BARCELLOS, N. M.; DE CARVALHO, M. M.; MARTINS, A. S. Impact of integrative and complementary practices on the health of the Brazilian population: a systematic review. *Revista brasileira de medicina*, v. 76, n. 3, p. 215-226, 2019. (<https://doi.org/10.36429/rbm/2020.76.003>).
11. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 1986 Nov-Dec;17(6):1304-8. doi: 10.1161/01.str.17.6.1304. PMID: 2433817.
12. Bellum S, Thuett KA, Grajeda R, Abbott LC. Coordination deficits induced in young adult mice treated with methylmercury. *Int J Toxicol* 2007; 26:115–121.
13. BENJAMIN EJ, MUNTNER P, ALONSO A, BITTENCOURT MS, CALLAWAY CW, CARSON AP, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar; 139(10): e56-e528. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>.
14. Bertelli, JA, & Mira, JC (1995). O teste de preensão: um método comportamental simples para avaliação quantitativa objetiva da regeneração nervosa periférica no rato. *Journal of Neuroscience Methods*, 58(1-2), 151–155. doi:10.1016/0165-0270(94)00169-h.
15. Bi, R., Chen, S., Chen, S. et al. O papel dos leucócitos na trombose aguda relacionada ao acidente vascular cerebral isquêmico: um tópico notável, mas negligenciado. *Célula. Mol. Life Sci.* 78, 6251–6264 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03897-5>.
16. Bitencourt, ACS. Análise de citocinas no acidente vascular cerebral. Uberaba 2020. Disponível: em: <https://bdtd.uftm.edu.br/bitstream/123456789/1147/1/DISSERT%20ANA%20C%20S%20BITENCOURT.pdf>. Último acesso em: 21 de setembro de 2024.
17. Brosseau L, Welch V, Wells G, Tugwell P, de Bie R, Gam A, Harman K, Shea B, Morin M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol*. 2000 Aug;27(8):1961-9. PMID: 10955339.

18. BUCHAN, M. A., BALANI, S. J., & ARBA, F. Epidemiologia da prevenção do acidente vascular cerebral e urgência do tratamento. In: barnett, m. J. H., & spence, j. D. Acidente vascular cerebral, prevenção, tratamento e reabilitação. 1ª. Ed. São paulo: amgh; 2013. P.2-8.
19. Buraczynska K, Luchowski P, Wojczal J, Ksiazek A, Stelmasiak Z. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) A-2518G gene polymorphism in stroke patients with different comorbidities. Clin Biochem. 2010 Dec;43(18):1421-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.09.011. Epub 2010 Sep 27. PMID: 20880493.
20. Camerin C, Bittencourt RD, Rodrigues LP. Equilíbrio e força de membros inferiores correlacionam-se com velocidade de marcha em pacientes com AVC: um estudo observacional. Rev Pesqui Fisioter. 2021;11(4):783-790. <http://dx.doi.org/10.17267/2238-2704rpf.v11i4.4162>.
21. Cao W, Hou FF, Nie J. AOPPs and the progression of kidney disease. Kidney Int. Suppl. 2014; 4:102-106.
22. CAVALCANTE, D. A. K., FURTADO, T. A., VALENTE, J. R. R., ALMEIDA, U. T. F. H., SOUSA, T. C., SOUSA, E. J. S., et al. Qualidade de vida de pacientes após acidente vascular encefálico isquêmico atendidos em uma clínica de neurologia em belém-pará. Braz. J. Hea. Rev. [periódico online] 2020 [citado 2022 dez 13]; 3(5):12452-64. Disponível em: (<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/16657/13612>)
23. Chakraborty S, Singh OP, Dasgupta A, Mandal N, Das HN. Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive-compulsive disorder. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2009. 33(2):363–366. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.01.001>.
24. Chan, PH. Radicais reativos de oxigênio na sinalização e danos no cérebro isquêmico. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 21(1), 2–14. (2001). Doi:10.1097/00004647-200101000-00002.
25. Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. PLoS One. 2011;6(7):e22453. doi: 10.1371/journal.pone.0022453. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21814580; PMCID: PMC3141042.
26. Chen J, Shen NA, Duan X, Guo Y. An investigation of the mechanism of dexmedetomidine in improving postoperative cognitive dysfunction from the

perspectives of alleviating neuronal mitochondrial membrane oxidative stress and electrophysiological dysfunction experimental and therapeutic medicine. 2018; 15:2037-2043.

27. Choi, DW. Morte celular excitotóxica. *Journal of Neurobiology*, 23(9), 1261–1276. 1992. Doi:10.1002/neu.480230915.

28. Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J. Anticorpos contra moléculas de adesão reduzem a apoptose após oclusão transitória da artéria cerebral média no cérebro de ratos. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16 (4):578–584.

29. Chow, RT, Johnson, MI, Lopes-Martins, RA, & Bjordal, JM. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no tratamento da dor no pescoço: uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados controlados por placebo ou tratamento ativo. *The Lancet*, 374(9705), 1897–1908. 2009. Doi:10.1016/s0140-6736(09)61522-1.

30. Chung, H., Dai, T., Sharma, SK, Huang, Y.-Y., Carroll, JD, & Hamblin, MR. Os detalhes da terapia a laser (luz) de baixa intensidade. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(2), 516–533. 2011. Doi:10.1007/s10439-011-0454-7.

31. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diretriz Da Prática De Eutanásia Do CONCEA - Resolução Normativa nº 37 - de 27/01/18. Disponível em: https://ceua.ufes.br/sites/ceua.ufes.br/files/field/anexo/resolucao-normativa-n-37-diretriz-da-pratica-de-eutanasia_site-concea_0.pdf. Acessado em 19/09/2023.

32. Costa CM, Dos Santos RCC, Lima E. A simple automated procedure for thiol measurement in human and serum samples. *J Braz Patol Med Lab* 2006;42:345-50.

33. Crawley JN. What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice, 2nd ed. New Jersey: Wiley-Liss; 2007.

34. CUNHA, JP Et al. Effects of low-level laser therapy on ischemic stroke recovery: a meta-analysis. *Photomedicine and laser surgery*, v. 39, n. 2, p. 75-84, 2021. (<https://doi.org/10.1089/pho.2020.4911>).

35. CURY, Vivian. Efeito fotobiomodulador da terapia laser de baixa intensidade na transição inflamação-reparo em modelo de lesão pulmonar. 2013. Tese (Doutorado em Processos Inflamatórios e Alérgicos) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.5.2013.tde-03122013-095832.

36. Dantas, E.P.V., Martignago, C.C.S., Tim, C.R., Filho, R.J.S.B., Neves, T.M.A., Assis, L. (2020). Fotobiomodulação como coadjuvante no tratamento na lesão

pulmonar aguda decorrente da sepse. *Research, Society and Development*. 9. e5929109024. 10.33448/rsd-v9i10.9024.

37. Davis SM, Pennypacker KR. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochem Int*. 2017 Jul;107:23-32. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.007. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28043837; PMCID: PMC5461189.

38. Davoine F, LACY P. Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol* 2014; 5: 570.

39. DeLong, J.H., Ohashi, S.N., O'Connor, K.C. et al. Inflammatory Responses After Ischemic Stroke. *Semin Immunopathol* 44, 625–648 (2022). <https://doi.org/ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00281-022-00943-7>

40. DeLong, JH, Ohashi, SN, O'Connor, KC et al. Respostas inflamatórias após acidente vascular cerebral isquêmico. *Semin Immunopathol* 44 , 625–648 (2022). (<https://doi.org/10.1007/s00281-022-00943-7>).

41. Desai A, Oh D, Rao EM, Sahoo S, Mahajan UV, et al. (2023) Impact of anemia on acute ischemic stroke outcomes: A systematic review of the literature. *PLOS ONE* 18(1): e0280025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280025>

42. Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999. Doi: 10.1016/s0166-2236(99)01401-0.

43. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015 Março; 35(5): p. 1066–1070.

44. Essig F, Kollikowski AM, Pham M, Solymosi L, Stoll G, Haeusler KG, Kraft P, Schuhmann MK (2020) Análise imunohistológica de neutrófilos e armadilhas extracelulares de neutrófilos em tromboembolia humana que causam acidente vascular cerebral isquêmico agudo. *Int J Mol Sci* 21:7387

45. Elkind MSV, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, Lansberg MG, Tang W, Kasliwal R, Elkins J (2020) Natalizumab em acidente vascular cerebral isquêmico agudo (ACTION II): Um ensaio randomizado, controlado por placebo. *Neurology* 95:e1091–e1104.

46. Elkins J, Veltkamp R, Montaner J, Johnston SC, Singhal AB, Becker K, Lansberg MG, Tang W, Chang I, Muralidharan K, Gheuens S, Mehta L, Elkind MSV (2017) Segurança e eficácia do natalizumabe em pacientes com acidente vascular

cerebral isquêmico agudo (ACTION): um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego de fase 2. *Lancet Neurol* 16:217–226

47. Erta, M., Quintana, A., Hidalgo, J. Interleucina-6, uma importante citocina no sistema nervoso central. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1254-1266. (2012). <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.

48. Fanaeia H, Karimianb SM, Sadeghipourb HR, Hassanzadec G, Kasaeiane A, Attarid F, et al. Testosterone enhances functional recovery after stroke through promotion of antioxidant defenses, BDNF levels and neurogenesis in male rats. *Brain Research*. 2014; 1558:74–83.

49. Fernandes KPS, Ferrari RM, Bussadori SK, Franca CM (2021) Vascular photobiomodulation. *Photobiomodul Photomed Laser Surg* 39:143–144. <https://doi.org/10.1089/photob.2020.4965>.

50. Fernando G, Yamila R, Cesar GJ, Ramón R. Neuroprotective Effects of neuro EPO Using an In Vitro Model of Stroke. *Behav. Sci.* 2018; 8:26.

51. Ferraresi, C, Kaippert, B, Avci, P, Huang, YY, de Sousa, MVP, Bagnato, VS. Hamblin, MR. Terapia a laser de baixa intensidade (luz) aumenta o potencial da membrana mitocondrial e a síntese de ATP em miotubos C2C12 com uma resposta de pico em 3-6 h. *Fotoquímica e fotobiologia*, 91(2), 411–416. 2014. Doi:10.1111/php.12397.

52. Ferreira, ACD.; Batista, ALA.; Catão, MHC De V. O desempenho da fototerapia na angiogênese e reparação tecidual. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e34610313334, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.13334. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13334>. Acesso em: 15 set. 2024.

53. Feske, SK (2021). Acidente vascular cerebral isquêmico. *O Jornal Americano de Medicina*. doi:10.1016/j.amjmed.2021.07.027.

54. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ, Zettler CG, Lech O, et al. Lowlevel laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized achilles tendon. *Lasers Surg Med*. 2005;37(4):293-300.

55. Frieler RA, Chung Y, Ahlers CG, Gheordunescu G, Song J, Vigil TM, Shah YM, Mortensen RM (2017) A deficiência genética de neutrófilos melhora a lesão de isquemia-reperfusão cerebral. *Exp Neurol* 298:104–111

56. Fukuda, T. Y., Tanji, M. M., de Jesus, J. F., da Silva, S. R., Sato, M. N., & Plapler, H. (2012). Infrared low-level diode laser on serum chemokine MCP-1

modulation in mice. *Lasers in Medical Science*, 28(2), 451–456. doi:10.1007/s10103-012-1072-9 10.

57. Fukuda, T. Y., et al. (2013). Short-term efficacy of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: a randomized placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, 15(3), 229-235. <https://doi.org/10.1590/S0102-36162011000500008>.

58. Garcia-Bonilla L, Moore JM, Racchumi G, Zhou P, Butler JM, Iadecola C, Anrather J (2014) A sintase de óxido nítrico induzível em neutrófilos e endotélio contribui para lesão cerebral isquêmica em camundongos. *J Immunol* 193:2531–2537

59. Gbd 2019, stroke collaborators. Global burden of stroke and risk factors, 1990-2019: findings from the global burden of disease study 2019. *The lancet neurology*, v. 20, n. 10, p. 795-819, 2020. ([https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00252-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00252-0)).

60. Genkin, V.M., Novikov, V.F., Paramonov, L.V., and Elkina, B.I. (1989). Effects of low-intensity laser irradiation on the state of blood proteins. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 108, 188–190.

61. GERMOGLIO, C. M., SANTOS, B. G. B., LAUDELINO, C. Q. A., LEITE, J. V. L. C. N., FERNANDES, M. N., SOUZA, M. L. Avci agudo da região parieto-occipital: anatomia cerebral voltada para clínica. *Brazilian journal of health review*. [periódico online] 2022 [citado 2022 dez 13]; 5(1):3328-37. Disponível em: (<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/44294/pdf>).

62. Göebel A, Kavanagh E, Lyons A, Saporoschetz IB, Soberg C, Lederer JA, et al. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Ann Surg.* 2000;231(2):253-61.

63. GOMES, Bruno José Nascimento. Efeitos da irradiação com laser de baixa potência (LLLT) em neutrófilos maduros cultivados ex vivo e in vitro na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*. 2021. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG, 2021.

64. Gruol DL, Nelson TE. Papéis fisiológicos e patológicos da interleucina-6 no sistema nervoso central. *Mol Neurobiol.* 1997; 15 :307–339

65. . Guo LB, Liu S, Zhang F, Mao GS, Sun LZ, Liu Y. The role of eosinophils in stroke: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015 Oct;19(19):3643-8. PMID: 26502854.

66. Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª edição. Pág. 206-207. ISBN: 978-85-352-4980-4.

67. Hamblin, MR. Mecanismos e aplicações dos efeitos anti-inflamatórios da fotobiomodulação. *AIMS Biophysics*, 4(3), 337–361. (2017). Doi:10.3934/biophy.2017.3.337.
68. Hamblin, MR and Demidova, TN. Mechanisms of low level light therapy, *Proc. SPIE 6140, Mechanisms for Low-Light Therapy*, 614001 (10 February 2006); <https://doi.org/10.1117/12.646294>.
69. Hamblin MR. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. *J Neurosci Res*. 2018 Apr;96(4):731-743. doi: 10.1002/jnr.24190. Epub 2017 Nov 13. Erratum in: *J Neurosci Res*. 2019 Mar;97(3):373. doi: 10.1002/jnr.24376. PMID: 29131369; PMCID: PMC5803455.
70. Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC (2005) Efeito da depleção de neutrófilos na expressão de gelatinase, formação de edema e transformação hemorrágica após acidente vascular cerebral isquêmico focal. *BMC Neurosci* 6:49
71. HE, Q. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Frontiers in neuroscience*, v. 15, p. 681034, 2021. (<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.681034>).
72. Hossmann, K.-A. Limiares de viabilidade e a penumbra da isquemia focal. *Annals of Neurology*, 36(4), 557–565. 1994. Doi:10.1002/ana.410360404.
73. Hou Y, Yang D, Xiang R, Wang H, Wang X, Zhang H, Wang P, Zhang Z, Che X, Liu Y, Gao Y, Yu X, Gao X, Zhang W, Yang J, Wu C (2019) Os neutrófilos N2 podem participar da recuperação espontânea após isquemia cerebral transitória ao inibir a lesão neuronal isquêmica em ratos. *Int Immunopharmacol* 77:105970
74. Huang, Y.-Y., Chen, AC-H., Carroll, JD, & Hamblin, MR. Resposta à dose bifásica na terapia de luz de baixa intensidade. *Dose-resposta*, 7(4), dose–response.0. 2009. Doi:10.2203/dose-response.09-027.hamblin.
75. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602-18. doi: 10.2203/dose-response.11-009.Hamblin. Epub 2011 Sep 2. PMID: 22461763; PMCID: PMC3315174.
76. Huang, Y.-Y., Gupta, A., Vecchio, D., Arce, V.J.B.d., Huang, S.-F., Xuan, W. and Hamblin, M.R. (2012), Transcranial low level laser (light) therapy for traumatic brain injury. *J. Biophoton.*, 5: 827-837. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200077>.

77. Huang WY, Tuan SH, Li MH, Hsu PT. Efficacy of a novel walking assist device with auxiliary laser illuminator in stroke Patients~ a randomized control trial. *J Formos Med Assoc.* 2022 Mar;121(3):592-603. doi: 10.1016/j.jfma.2021.06.019. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34247893.
78. Ishikawa M, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Respostas inflamatórias à isquemia e reperfusão na microcirculação cerebral. *Front Biosci.* 2004; 9 :1339–1347.
79. Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem.* 2016 May;159(5):491-6. doi: 10.1093/jb/mvw009. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26861995.
80. Johnson JL, Moore EE, Tamura DY, Zallen G, Biffi WL, Silliman CC. A interleucina-6 aumenta o potencial citotóxico dos neutrófilos por meio do aumento seletivo da liberação de elastase. *J Surg Res.* 1998; 76 :91–94. doi: 10.1006/jsre.1998.5295.
81. Kang L, Yu H, Yang X, Zhu Y, Bai X, Wang R, Cao Y, Xu H, Luo H, Lu L, Shi MJ, Tian Y, Fan W, Zhao BQ (2020) Armadilhas extracelulares de neutrófilos liberadas por neutrófilos prejudicam a revascularização e a remodelação vascular após acidente vascular cerebral. *Nat Commun* 11:2488
82. Karu, T. I. (2003). Low-power laser therapy. In Vo-Dinh, T. (Ed.), *Biomedical Photonics Handbook* (pp. 48-1–48-25).
83. Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory responses in brain ischemia. *Curr Med Chem.* 2015;22(10):1258-77. doi: 10.2174/0929867322666150209154036. PMID: 25666795; PMCID: PMC5568039.
84. Kawano T, Shimamura M, Nakagami H, Kanki H, Sasaki T, Mochizuki H (2019) Perfil temporal e espacial de células supressoras derivadas de mieloides polimorfonucleares (PMN-MDSCs) em acidente vascular cerebral isquêmico em camundongos. *PLoS ONE* 14:e0215482
85. Kim HJ, Wei Y, Wojtkiewicz GR, Lee JY, Moskowitz MA, Chen JW (2019) A redução da atividade da mieloperoxidase diminui a inflamação e aumenta a proteção celular no acidente vascular cerebral isquêmico. *J Cereb Blood Flow Metab* 39:1864–1877
86. Kim SW, Lee H, Lee HK, Kim ID, Lee JK (2019) Armadilha extracelular de neutrófilos induzida por HMGB1 exacerba danos no cérebro isquêmico. *Acta Neuropathol Commun* 7:94

87. KIM, T. H. Et al. Low-level laser therapy in neurological rehabilitation: lightening the path for chronic stroke recovery. *Neural regeneration research*, v. 15, n. 7, p. 1195-1205, 2020. (<https://doi.org/10.4103/1673-5374.271756>).
88. Kocic I, Kowianski P, Rusiecka I. Neuroprotective effect of masitinib in rats with postischemic stroke. 2015; 388: 79-86. 15.
89. Komori M, Takada K, Tomizawa Y et al (2009) Microcirculatory responses to acupuncture stimulation and phototherapy. *Anesth Analg* 108:635–640. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31819317bc>.
90. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, JelicIvanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*. 2015; 241:192-198.
91. Kraeuter, A.-K., Guest, PC, & Sarnyai, Z. (2018). O teste de campo aberto para medir a atividade locomotora e o comportamento semelhante à ansiedade. Modelos pré-clínicos, 99–103. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
92. Kujawa, J., Zavodnik, L., Zavodnik, I., Buko, V., Lapshyna, A., & Bryszewska, M. (2004). Effect of Low-Intensity (3.75-25 J/cm²) Near-Infrared (810 nm) Laser Radiation on Red Blood Cell ATPase Activities and Membrane Structure. *Journal of Clinical Laser Medicine Surgery*, 22(2), 111–117. doi:10.1089/104454704774076163.
93. Lane N. Cell biology: power games. *Nature*. 2006 Oct 26;443(7114):901-3. doi: 10.1038/443901a. PMID: 17066004.
94. LAPCHAK, P. A. Taking a light approach to treating acute ischemic stroke patients: transcranial near-infrared laser therapy translational science. *Annals of medicine*, v. 42, n. 8, p. 576-586, 2010. (<https://doi.org/10.3109/07853890.2010.532811>).
95. Lauw FN, Dekkers PE, te Velde AA, Speelman P, Levi M, Kurimoto M, et al. Interleukin-12 induces sustained activation of multiple host inflammatory mediator systems in chimpanzees. *J Infect Dis*. 1999;179(3):646-52.
96. Leal-Junior EC, Vanin AA, Miranda EF, de Carvalho Pde T, Dal Corso S, Bjordal JM. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):925-39. doi: 10.1007/s10103-013-1465-4. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24249354.

97. Licata G, Tuttolomondo A, Corrao S, . Immunoinflammatory activation during the acute phase of lacunar and non-lacunar ischemic stroke: association with time of onset and diabetic state. 2006; 19: 639-646.
98. Li HL, Kostulas N, Huang YM, Xiao BG, van der Meide P, Kostulas V, Giedraitas V, Link H. IL-17 and IFN-gamma mRNA expression is increased in the brain and systemically after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neuroimmunol.* 2001; 116: 5–14.
99. Li L., Lou W., Li H., Zhu Y., Huang X. Ligante 2 de quimiocina CC Motif regulado positivamente promove acidente vascular cerebral isquêmico por meio da via de sinalização de quimiocina. 2020 ; 68 :476–486.
100. LI, Y. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery*, v. 39, n. 3, p. 156-166, 2021. (<https://doi.org/10.1089/photob.2020.4935>).
101. LIU, X. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*, v. 30, n. 3, p. 105669, 2021. Doi: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105669].
102. Lo, EH. Uma nova penumbra: transição de lesão para reparo após acidente vascular cerebral. *Nature Medicine*, 14(5), 497–500. 2008. Doi:10.1038/nm1735.
103. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84-91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84. PMID: 2643202.
104. LOPES, J. Et al. Caracterização sensório-motora de indivíduos após acidente vascular encefálico submetidos a fisioterapia neurofuncional. *Brazilian journal of health review*, v. 4, n. 3, p. 13268-78, 2021. Disponível em: [<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/31432/pd>].
105. Lopez TCC, Malavazzi TCDS, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva DT, Hi EMB, França CM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS. Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *J Biophotonics*. 2022 May;15(5):e202100271. doi: 10.1002/jbio.202100271. Epub 2022 Jan 19. PMID: 34978386.
106. Lopez TCC, Malavazzi TC dos S, Rodrigues MFSD et al (2022) Histological and biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *J Biophotonics* 1–12. <https://doi.org/10.1002/jbio.202100271>.

107. LUCIANELLI, J.D. Et al. A informação é a principal ferramenta para diminuir a grande incidência de acidente vascular cerebral - avc e seus agravos na população. *Brazilian journal of health review*, v. 5, n. 1, p. 88-94, 2022. Disponível em: [<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/42270/pdf>].
108. Luo WT, Lee CJ, Tam KW, Huang TW. Effects of Low-Level Laser Therapy on Muscular Performance and Soreness Recovery in Athletes: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Sports Health*. 2022 Sep-Oct;14(5):687-693. doi: 10.1177/19417381211039766. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34428975; PMCID: PMC9460079.
109. Ma, X. & Trinchieri, G. Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv. Immunol.* 79, 55–92 (2001).
110. Ma X, Yan W, Zheng H, et al. Regulação da produção e função de IL-10 e IL-12 em macrófagos e células dendríticas . *F1000Research* 2015 ; 4 : 1465.
111. Maes M, Brinholi FF, Michelin AP, Matsumoto AK, de Oliveira Semeão L, Almulla AF, Supasitthumrong T, Tunvirachaisakul C, Barbosa DS. In Mild and Moderate Acute Ischemic Stroke, Increased Lipid Peroxidation and Lowered Antioxidant Defenses Are Strongly Associated with Disabilities and Final Stroke Core Volume. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jan 12;12(1):188. doi: 10.3390/antiox12010188. PMID: 36671047; PMCID: PMC9854933.
112. Malavazzi, TCS, Fernandes, KPS, Lopez, TCC et al. Efeitos da fotobiomodulação sistêmica invasiva e não invasiva usando laser de baixa potência em modelos experimentais: Uma revisão sistemática. *Lasers Med Sci* 38 , 137 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03799-x>.
113. Malavazzi, TCS, et al., Preventive and therapeutic vascular photobiomodulation decreases the inflammatory markers and enhances the muscle repair process in an animal model, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 256, 2024, 112921, ISSN 1011-1344. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112921>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134424000812>).
114. Maldotti, A. Amadelli, R. Bartocci, C. Carassiti, V. Polo, E. Varani, G. Photochemistry of Iron-porphyrin complexes. *Biomimetics and catalysis, Coordination Chemistry Reviews*, Volume 125, Issues 1–2, 1993, Pages 143-154, ISSN 0010-8545, [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(93\)85014-U](https://doi.org/10.1016/0010-8545(93)85014-U). (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001085459385014U>)

115. Martinelli A, Andreo L, Malavazzi TC dos S et al (2022) Vascular photobiomodulation increases muscle fiber diameter and improves the gait during compensatory hypertrophy of plantar muscle in rats. *J Biophotonics*. <https://doi.org/10.1002/jbio.202200192>.
116. Martins, A.F.L., Morais, M.O., Sousa-Neto, S.S., Oton-Leite, A.F., Pereira, C.H., Valadares, M.C., Freitas, N.M.A., Batista, A.C., Leles, C.R. and Mendonça, E.F. (2021), The Effect of Photobiomodulation on Nitrite and Inflammatory Activity in Radiotherapy-Induced Oral Mucositis: A Randomized Clinical Trial. *Lasers Surg Med*, 53: 671-683. <https://doi.org/10.1002/lsm.23328>.
117. Mattson, MP. Apoptose em distúrbios neurodegenerativos. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 120–130. 2000. Doi:10.1038/35040009.
118. Mechelinck M, Kupp C, Krüger JC, Habigt MA, Helmedag MJ, Tolba RH, et al. (2019) A inalação de oxigênio melhora a sobrevivência pós-operatória em ratos anestesiados com cetamina-xilazina: um estudo observacional. *PLoS ONE* 14(12): e0226430. doi:10.1371/journal.pone.0226430.
119. MILANO, F. Et al. Expression pattern of immune suppressive cytokines and growth factors in oesophageal adenocarcinoma reveal a tumour immune escape-promoting microenvironment. *Scand j immunol.*, v. 68, n. 6, p. 616-23, 2008. Doi: [10.1111/j.1365-3083.2008.02183.x]..
120. Ministério da saúde. Datasus: informações de saúde (tabnet), 2021. Disponível em: [<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>].
121. Ministério da saúde. Política nacional de práticas integrativas e complementares no sus. Brasília: ministério da saúde, 2018. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf].
122. MIZUKAMI, A. Et al. Efficacy of low-level laser therapy for ischemic stroke: a systematic review. *Japanese journal of neurosurgery*, v. 30, n. 1, p. 12-19, 2021. Doi: [10.7887/jjns.30.12].
123. Mohammed, HS, & Khadrawy, YA (2022). Efeitos antidepressivos e antioxidantes da irradiação transcraniana com laser de baixa potência de 830 nm em um modelo animal de depressão. *Lasers in Medical Science*, 37 (3), 1615–1623. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03410-1>Return to ref 31 in article.
124. Mojarad N, Janzadeh A, Yousefifard M, Nasirinezhad F. The role of low level laser therapy on neuropathic pain relief and interleukin-6 expression following spinal

- cord injury: An experimental study. *J Chem Neuroanat.* 2018 Jan;87:60-70. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.04.005. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28428016.
125. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 Apr 15;811:60-7; discussion 67-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb51989.x. PMID: 9186585.
126. NASCIMENTO, M. H. L. Et al. Instrumentos utilizados por fisioterapeutas para a avaliação de pacientes com sequelas de acidente vascular cerebral. *Brazilian journal of health review*, v. 5, n. 4, p. 12568-84, 2022. Disponível em: [<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/50219/pdf>].
127. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Osman NA, Fayad T, Nassef A, Salem MM, Sharaf EDU. The association between fibroblast growth factor-23 and vascular calcification is mitigated by inflammation markers. *Nephron Extra.* 2013; 3:106-112.
128. Nogueira GG; Nogueira, MG; Castro, TE; Maller, ACPA. Avaliação da influência dos marcadores inflamatórios na mortalidade de pacientes com AVC isquêmico. *Revista Brasileira de Neurologia.* Volume 57, N°3, jul/ago/set, 2021.
129. Nowicka D, Rogozinska K, Aleksy M, Witte OW, Skangiel-Kramska J. Dinâmica espaço-temporal das respostas astrogliais e microgliais após acidente vascular cerebral fototrombótico no cérebro de ratos. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008; 68 (2):155–168.
130. Oliveira, A. L., Perez, E., Souza, J. B., & Vasconcelos, M. (2014). *Curso Didático De Estética 2 (2 Ed.)*. São Caetano Do Sul, Sp: Yendis. ISBN: 9788577283590.
131. Oliveira AFSS de, Silva JL da, Camillo CAM, Andraus RAC, Maia LP. Does photobiomodulation improve muscle performance and recovery? A systematic review. *Rev Bras Med Esporte [Internet].* 2023;29:e2021_0412. Available from: https://doi.org/10.1590/1517-8692202329012021_0412.
132. Oliveira, R. G., Ferreira, A. P., Côrtes, A. J., Aarestrup, B. J. V., Andrade, L. C., & Aarestrup, F. M. (2013). Low-level laser reduces the production of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 induced by OVA. *Lasers in Medical Science*, 28(6), 1519–1525. doi:10.1007/s10103-012-1262-5.
133. Oliveira Sierra S, Melo Deana A, Mesquita Ferrari RA, Maia Albarello P, Bussadori SK, Santos Fernandes KP. Effect of low-level laser therapy on the post-surgical inflammatory process after third molar removal: study protocol for a double-

blind randomized controlled trial. *Trials*. 2013 Nov 6;14:373. doi: 10.1186/1745-6215-14-373. PMID: 24195796; PMCID: PMC3832037.

134. O'Shea, J.J. & Paul, W.E. Regulation of TH1 differentiation—controlling the controllers. *Nat. Immunol.* 3, 506–508 (2002).

135. P.A. Lapchak, K.F. Salgado, C.H. Chao, J.A. Zivin, *Neuroscience*, Volume 148, Issue 4, 2007, Pages 907-914, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.002>.

136. PANKO, J. Et al. Efficacy of systemic low-level laser therapy in treatment of ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*, v. 29, n. 4, p. 104651, 2020. Doi: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104651].

137. Parlato G, Cimmino G, De Vendittis E, Monfrecola G, Bocchini V. Superoxide dismutase activity in the skin of rats irradiated by He-Ne laser. *Experientia*. 1983;39(7):750-1.

138. PASSARELLA, S.; T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 140, p. 7-19, 2014.

139. Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urra X, Chamorro A, Planas AM (2015) Recrutamento de neutrófilos para o cérebro em ratos e derrames isquêmicos humanos. *Acta Neuropatol* 129:239–257

140. Potapov AF, Trepilets VE, Mel'nik OB, Shilo Vlu. Effects of intravascular laser irradiation of blood on lipid peroxidation in patients with abdominal surgery. *Anesteziol Reanimatol*. 1995;1:19-22.

141. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A. A imunodeficiência induzida por AVC promove infecções bacterianas espontâneas e é mediada pela reversão da ativação simpática pela imunoestimulação semelhante à célula T auxiliar tipo 1 pós-AVC. *J Exp Med* . 2003; 198 : 725–736.

142. Protti GG, Gagliardi RJ, Forte WC, Sprovieri SR. A interleucina-10 pode proteger contra lesões progressivas durante a fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico . *Arq Neuropsiquiatr* (2013) 71 (11):846–51. 10.1590/0004-282X20130168.

143. Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33.
144. Ramadori G, Christ B. Citocinas e a resposta hepática de fase aguda. *Semin Liver Dis.* 1999; 19 :141–155.
145. RANGEL, Bianca Tavares et al. Técnica de ILIB modificada: uma revisão de literatura. 2021, Anais.. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021. . Acesso em: 01 set. 2024.
146. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, et al. Biomarcadores precoces de acidente vascular cerebral. *Clin Chem* . 2003; 49 (10):1733–1739.
147. Rosario de la Torre M, Casado A, López-Fernández M, Carrascosa D, Casado M, Venarucci D, Venarucci V. Distúrbios cerebrais do envelhecimento humano: Papel das enzimas antioxidantes. *Neurochem Res.* 1996; 21 :885–888.
148. Roshchina AA, Nikolaeva SS, Kozhura VL et al (2003) Water status and LPO in rat tissues during massive blood loss and irradiation with He-Ne laser. *Bull Exp Biol Med* 135:136–138. [https:// doi.org/10.1023/A:1023859529038](https://doi.org/10.1023/A:1023859529038).
149. Rouhani M, Tolentino M, Lyons JA, Ng AV. Effects of photobiomodulation therapy on muscle function in individuals with multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2024 Jun;86:105598. doi: 10.1016/j.msard.2024.105598. Epub 2024 Apr 1. PMID: 38614054.
150. SANTOS, H. S. Et al. Laser therapy in neurorehabilitation of stroke patients: systematic review and meta-analysis. *Lasers in medical science*, v. 36, n. 2, p. 309-321, 2021. Doi: [10.1007/s10103-020-03147-3].
151. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlações e interações na produção de interleucina-6 (IL-6), IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) em células mononucleares do sangue humano: IL-6 suprime IL-1 e TNF. *Sangue.* 1990; 75 :40–47.
152. Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 7-16.
153. Sharma D, Spring KJ, Bhaskar SMM. Neutrophil-lymphocyte ratio in acute ischemic stroke: Immunopathology, management, and prognosis. *Acta Neurol Scand.* 2021 Nov;144(5):486-499. doi: 10.1111/ane.13493. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34190348.
154. Shen Z, Huang Y, Zhou Y, Jia J, Zhang X, Shen T, Li S, Wang S, Song Y, Cheng J. Association between red blood cell distribution width and ischemic stroke recurrence

in patients with acute ischemic stroke: a 10-years retrospective cohort analysis. *Aging* (Albany NY). 2023 Apr 12;15(8):3052-3063. doi: 10.18632/aging.204657. Epub 2023 Apr 12. PMID: 37053005; PMCID: PMC10188350.

155. Shichita T, AGO T, KAMOUCI M, KITAZONO T, YOSHIMURA A, OOBOSHI H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 2012; 123 Suppl 2: 29-38.

156. Silva CR, de Almeida Salvego C, Rostelato ME, Zeituni CA, Ribeiro MS. Photobiomodulation therapy combined with radiotherapy in the treatment of triple-negative breast cancer-bearing mice. *J Photochem Photobiol B*. 2021 Jul;220:112215. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112215. Epub 2021 May 17. PMID: 34029847.

157. SILVA, R. G. Et al. Perfil epidemiológico da unidade de AVC em um hospital de ensino. *Brazilian journal of health review*, v. 4, n. 5, p. 22023-30, 2021. Disponível em: [<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/bjhr/article/view/37337/pdf>].

158. SILVA, V. G.; MARTINS, W. The systemic action of the Intravascular Laser Irradiation of Blood (Ilib) therapy to strengthen the immune system and the inflammatory process: an integrative review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 12, n. 6, p. e24612642265, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i6.42265.

159. Silveira PCL, Silva LA, Tuon T, Freitas TP, Streck EL, Pinho RA. ISSN 1413-3555 *Rev Bras Fisioter*, São Carlos, v. 13, n. 4, p. 281-7, jul./ago. 2009.

160. Silveira, PCL, Scheffer, D. da L., Glaser, V., Remor, AP, Pinho, RA, Aguiar Junior, AS, & Latini, A. (2016). Terapia a laser de baixa intensidade atenua a resposta inflamatória aguda induzida por lesão muscular traumática. *Free Radical Research*, 50(5), 503–513. doi:10.3109/10715762.2016.1147649.

161. Silveira, P. C. L., Scheffer, D. da L., Glaser, V., Remor, A. P., Pinho, R. A., Aguiar Junior, A. S., & Latini, A. (2016). Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radical Research*, 50(5), 503–513. doi:10.3109/10715762.2016.1147649.

162. Siposan, G.D., and Lukacs, A. (2001). Relative Variation to Received Dose of Some Erythrocytic and Leukocytic Indices of Human Blood as a Result of Low-Level Laser Radiation: An in Vitro Study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* Volume 19, Number 2, 2001 Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 89–103.

163. Siposan, G.D., and Lukacs, A. (2000). Effect of low-level laser radiation (IIR) on some rheological factors in human blood: an in vitro study. *J. Clin. Laser Med. & Surg.* 18, 185–195.

164. Siposan, G.D., and Lukacs, A. (1999). Experimental study of lowlevel laser radiation effects on human blood cells. Oral presentation at International Congress "Lasers and Health-99", 8–10 December 1999, Moscow. Abstract published in Proceedings of Congress, p. 550.
165. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004 Jan 15;4:2. doi: 10.1186/1471-2377-4-2. PMID: 14725719; PMCID: PMC331413.
166. Souza NHC , Mesquita-Ferrari RA , Rodrigues MFSD , et al. Fotobiomodulação e diferentes fenótipos de macrófagos durante o reparo do tecido muscular . *J Cell Mol Med* . 2018 ; 22 : 4922 – 4934 . <https://doi.org/10.1111/jcmm.13757>.
167. Speetzen, LJ, Endres, M., & Kunz, A. (2013). Oclusão bilateral da artéria carótida comum como um estímulo de pré-condicionamento adequado para induzir tolerância isquêmica precoce à isquemia cerebral focal. *Journal of Visualized Experiments*, (75). doi:10.3791/4387.
168. Stephan, W. , Banas, L. , Misiak, M. , Brierley, W. e Hamblin, M. (2023) Fotobiomodulação com laser superpulsado mostra eficácia para acidente vascular cerebral e afasia: estudos de caso. *World Journal of Neuroscience* , 13 , 12-20. doi: 10.4236/wjns.2023.131002.
169. Taffi R, Nanetti L, Mazzanti M, Bartolini A, Vignini F, Raffaelli P. et al. Plasma levels of nitric oxide and stroke outcome. *J Neurol.* 2008; 255:94–98.
170. Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):323-8. doi: 10.1089/pho.2007.2184. PMID: 18665762; PMCID: PMC2996814.
171. Tanne, D., Molshatzki, N., Merzeliak, O. et al. Estado de anemia, concentração de hemoglobina e resultado após acidente vascular cerebral agudo: um estudo de coorte. *BMC Neurol* 10 , 22 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-22>
172. Tate WJ, Polding LC, Kemp S, Mlynash M, Heit JJ, Marks MP, et al. Thrombectomy Results in Reduced Hospital Stay, More Home-Time, and More Favorable Living Situations in DEFUSE 3. *Stroke.* 2019 Jul 10: STROKEAHA119025165 [Epub ahead of print].

173. Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladâcenco O, Roza E, Costăchescu B, Grumezescu AM, Teleanu RI. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 May 25;23(11):5938. doi: 10.3390/ijms23115938. PMID: 35682615; PMCID: PMC9180653.
174. THAYABARANATHAN, T. Et al. Estatísticas globais de AVC 2022. *International journal of stroke*, v. 17, n. 9, p. 946-956, 2022. Doi: [10.1177/17474930221123175].
175. Tian T, Wang Z, Chen L, Xu W, Wu B. Photobiomodulation activates undifferentiated macrophages and promotes M1/M2 macrophage polarization via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2023 Mar 18;38(1):86. doi: 10.1007/s10103-023-03753-x. PMID: 36932298.
176. Tokgoz S, Keskin S, Kayrak M, Ogmegul. Is neutrophil/ lymphocyte ratio predict to short-term mortality in acute cerebral infarct independently from infarct volume? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2014 Setembro; 23(8): p.2163-2168.
177. Tomimura S, Silva BPA, Sanches IC et al (2014) Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol* 161–164. <https://doi.org/10.5935/abc.20140117>.
178. TORABI, R. Et al. The effects of low-level laser therapy on ischemic stroke recovery: a review of experimental studies. *Laser therapy*, v. 29, n. 1, p. 53-61, 2020. Doi: [10.5978/islsm.20-ok-07].
179. Transcranial near-infrared light therapy improves motor function following embolic strokes in rabbits: An extended therapeutic window study using continuous and pulse frequency delivery modes.
180. Trinchieri G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
181. Tripathi, AK, & Singh, AK (Eds.). (2021). Modelos e técnicas em biologia do acidente vascular cerebral. doi:10.1007/978-981-33-6679-4.
182. Tuner, J., & Hode, L. *Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background.* Grängesberg, Suécia: Prima Books AB, 2014.
183. Ulich TR, del Castillo J, Guo K. Efeitos hematológicos in vivo da interleucina-6 recombinante na hematopoiese e números circulantes de hemácias e leucócitos. *Sangue.* 1989; 73 :108–110.
184. Vermeij JD, Westendorp WF, van de Beek D, Nederkoorn PJ. Post-stroke infections and preventive antibiotics in stroke: Update of clinical evidence. *Int J Stroke.*

2018 Dec;13(9):913-920. doi: 10.1177/1747493018798557. Epub 2018 Sep 3. PMID: 30175940.

185. Vila N, Castillo J, Davalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Níveis de citocinas anti-inflamatórias e piora neurológica no acidente vascular cerebral isquêmico agudo . *Stroke* (2003) 34 (3):671–5. 10.1161/01.STR.0000057976.53301.69.

186. Wang H, Deng J, Tu W, Zhang L, Chen H, Wu X, Li Y, Sha H. The hematologic effects of low intensity 650 nm laser irradiation on hypercholesterolemia rabbits. *Am J Transl Res.* 2016 May 15;8(5):2293-300. PMID: 27347336; PMCID: PMC4891441.

187. WANG, L. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a review of mechanisms and efficacy. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases*, v. 30, n. 4, p. 105839, 2021. Doi: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105839].

188. WANG, Q., TANG, X., & YENARI, M. A resposta inflamatória no acidente vascular cerebral. *Journal of Neuroimmunology*, 184(1-2), 53–68. 2007. Doi:10.1016/j.jneuroim.2006.11.01.

189. Wang, R., Dong, Y., Lu, Y., Zhang, W., Brann, D. W., & Zhang, Q. (2020). Photobiomodulation for Global Cerebral Ischemia: Targeting Mitochondrial Dynamics and Functions. *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-018-1191-9.

190. WANG, Y. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Brain and behavior*, v. 11, n. 2, p. E02035, 2021. Doi: [10.1002/brb3.2035].

191. Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, Memanishvili T, Monni E, Tatarishvili J, Miskinyte G, Ge R, Ahlenius H, Lindvall O, Schwartz M, Kokaia Z (2016) Macrófagos derivados de monócitos contribuem para a recuperação funcional espontânea de longo prazo após acidente vascular cerebral em camundongos. *J Neurosci* 36:4182–4195

192. Wink, DA, Cook, JA, Krishna, MC, Hanbauer, I., Degraff, W., Gamson, J., & Mitchell, JB (1995). Óxido nítrico protege contra citotoxicidade mediada por peróxido de alquila: mais insights sobre o papel que o óxido nítrico desempenha no estresse oxidativo. *Arquivos de bioquímica e biofísica*, 319(2), 402–407. doi:10.1006/abbi.1995.1310.

193. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49:1304-1313.

194. WU, J. Et al. Mechanisms and efficacy of low-level laser therapy in stroke rehabilitation: a systematic review. *Neurorehabilitation and neural repair*, v. 35, n. 3, p. 228-238, 2021. Doi: [10.1177/1545968320987430].
195. XU, Z. Et al. Neuroprotective effects of low-level laser therapy on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Molecular neurobiology*, v. 58, n. 3, p. 1499-1511, 2021. Doi: [10.1007/s12035-021-02223-4].
196. XUAN, W. Et al. Transcranial low-level laser therapy improves neurological performance in traumatic brain injury in mice: effect of treatment repetition regimen. *Plos one*, v. 8, n. 1, p. E53454, 2013. (Doi: 10.1371/journal.pone.0053454).
197. Xuan W, Vatansever F, Huang L, Hamblin MR. Transcranial low-level laser therapy enhances learning, memory, and neuroprogenitor cells after traumatic brain injury in mice. *J Biomed Opt.* 2014;19(10):108003. doi: 10.1117/1.JBO.19.10.108003. PMID: 25292167; PMCID: PMC4189010.
198. Xu, Z., Guo, X., Yang, Y. et al. Irradiação a laser de baixa intensidade melhora comportamentos semelhantes à depressão em camundongos. *Mol Neurobiol* 54 , 4551–4559 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9983-2>.
199. Xue Y, Zeng X, Tu WJ, Zhao J. Tumor Necrosis Factor- α : The Next Marker of Stroke. *Dis Markers.* 2022 Feb 27;2022:2395269. doi: 10.1155/2022/2395269. PMID: 35265224; PMCID: PMC8898850.
200. Y. Lampl, J.A. Zivin, M. Fisher, R. Lew, L. Welin, B. Dahlof, B. Andersson, J. Perez, C. Caparo, S. Ilic, U. Oron Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1) *Stroke*, 38 (6) (2007), pp. 1843-1849.
201. Yamaikina IV, Mansurov VA, Gorbunova NB et al (2012) Rheology dynamics of the blood and plasma of rats after trans dermal laser irradiation of the tail vein in the infrared range. *J Eng Phys Thermophys* 85:655–661. <https://doi.org/10.1007/s10891-012-0698-6>.
202. Yang, L., Youngblood, H., Wu, C. et al. Mitocôndrias como alvo para neuroproteção: papel do azul de metileno e da fotobiomodulação. *Transl Neurodegener* 9 , 19 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00197-z>.
203. Yeh LC, Gonzalez N, Goldberg D. Comparison of a novel wound dressing vs current clinical practice after laser resurfacing. *J Cosmet Dermatol.* 2019 Aug;18(4):1020-1024.

204. Yilmaz G, Granger DN. Moléculas de adesão celular e acidente vascular cerebral isquêmico. *Neurol Res.* 2008; 30 (8):783–793.
205. Yilmaz, G. (2006). Papel dos linfócitos T e interferon- no acidente vascular cerebral isquêmico. *Circulation*, 113(17), 2105–2112. doi:10.1161/circulationaha.105.59.
206. YIN, J. Et al. Low-level laser therapy for ischemic stroke: a review of mechanisms and applications. *Laser therapy*, v. 30, n. 1, p. 53-61, 2021. Doi: [10.5978/islsm.21-ok-02].
207. Zago, Anderson Saranz e Zanesco, Angelina. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [online]. 2006, v. 87, n. 6, pp. e264-e270. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2006001900029>. Epub 18 Jan 2007. ISSN 1678-4170.
208. Zhang, F., & Chen, J. (2012). Medição de infarto em isquemia cerebral focal: coloração TTC. *Modelos animais de lesões neurológicas agudas II*, 93–98. doi:10.1007/978-1-61779-782-8_9.
209. Zhang Q, Dong T, Li P, Wu MX. Noninvasive low-level laser therapy for thrombocytopenia. *Sci Transl Med.* 2016 Jul 27;8(349):349ra101. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf4964. PMID: 27464749; PMCID: PMC7392149.
210. Zhevago, N. A., & Samoilova, K. A. (2006). Pro- and Anti-inflammatory Cytokine Content in Human Peripheral Blood after Its Transcutaneous (in Vivo) and Direct (in Vitro) Irradiation with Polychromatic Visible and Infrared Light. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(2), 129–139. doi:10.1089/pho.2006.24.129.
211. Zhu, R; Avsievich, T; Su, X; Bykov, A; Popov, A; Meglinski, I. Hemorheological alterations of red blood cells induced by 450-nm and 520-nm laser radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 230, 2022,112438, ISSN 1011-1344, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112438>.
212. Razavi *Int J Med.* 2016June;4(2):e38203. doi: 10.17795/rijm38203.



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA TERAPIA LASERTERAPIA SISTÊMICA EM MODELO DE ACIDENTE VASCULAR**

ENCEFALICO

Registrada sob o n.º 14/2022

sob a responsabilidade de **DIEGO FRANÇA PEDROSA**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 27 de janeiro de 2023.

Vigência da autorização: janeiro/2023

a dezembro/2026

Pesquisa

Finalidade:

Espécie(s): Mus musculus (camundongo)

Linhagem(ns)/raça(s): Swiss

Sexo: Macho

Peso: 30 a 40 gramas

Idade: 8 a 12 semanas

Número de animais: 50

Origem: Biotério Central da UFES-CCS.

Raquel Spinassé Dettogni
Coordenadora da CEUA-UFES
SIAPE 1134154

Vitória-ES, 27 de janeiro de 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Stephanie Oliveira de Araújo

**“Efeito modulador da laser terapia sistêmica na inflamação
em modelo de acidente vascular encefálico”**

VITÓRIA, ES

2024

P
P
G

B
i
o
t
e
c
n
o
l
o
g
i
a