

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DÉBORA ALICIA BUENDÍA PALACIOS

**FOTOBIMODULAÇÃO TRANSCRANIANA (FBMTC) APLICADA À
DOENÇA DE ALZHEIMER – MODELO EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, dezembro/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DÉBORA ALICIA BUENDÍA PALACIOS

**FOTOBIMODULAÇÃO TRANSCRANIANA (FBMTC) APLICADA À
DOENÇA DE ALZHEIMER – MODELO EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro
Co-Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fernandes Moretti

São José dos Campos, dezembro/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

DÉBORA ALICIA BUENDÍA PALACIOS

FOTOBIMODULAÇÃO TRANSCRANIANA (FBMTC) APLICADA À DOENÇA DE ALZHEIMER – MODELO EM RATOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Orientador
Doutorado em Engenharia Biomédica
Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Adriana Fernandes Moretti

Co-Orientadora
Doutorado em Engenharia Biomédica
Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Sebastian San Martín Henriquez

Universidad de Valparaíso - Chile

Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho

Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Livia Moreira da Silva Melo

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Afonso Shiguemi Inoue Salgado

Escola de Terapia Manual e Postural

São José dos Campos, dezembro/2022

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor, e do orientador.

DÉBORA ALICIA BUENDÍA PALACIOS

Engenheira Biomédica da Universidade Manuela Beltrán,
Mestre em Bioengenharia pela Universidade Camilo Castelo Branco,
Doutoranda em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi,
Docente em Engenharia Biomédica na Universidade de Valparaíso.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P176f Palacios, Débora Alicia Buendía
Fotobiomodulação transcraniana (FBMTC) aplicada a doenças de
Alzheimer – modelo em ratos / Débora Alicia Buendía Palacios – 2022.
80f.: 30 cm.

Orientador: Renato Amaro Zângaro.
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi
Morumbi, São José dos Campos, 2022.
Bibliografia: f. 72-79.

1. Engenheira Biomédica. 2. Fotobiomodulação transcraniana.
3. Doença de Alzheimer. 4. Eletrofisiologia. 5. Memória espacial e
Reconhecimento de objetos. I. Título.

CDD 610.28

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus anjos da guarda,
que me acompanharam e me abençoaram até o fim...
Aos que têm asas e aos que não têm.

AGRADECIMENTOS

A Deus: Pai, Mãe, Filho e Espírito Santo; pela fé, pela sabedoria, pelas ferramentas e pela força de vontade que me deram para chegar até este ponto da minha vida.

À minha família, Ariel, Deborita, Elipa, Dianacris, Erne e Pablo, por serem minha fonte de amor, meu apoio, meu norte e minha razão para viver... Amo vocês infinitamente.

Ao meu orientador, Dr. Renato Amaro Zângaro, que acreditou em mim desde o primeiro dia, me acompanhou e me ajudou por todos estes anos. Ele tem sido um exemplo de vida e um dos meus anjos da guarda.

À minha co-orientadora Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti, a quem admiro e respeito, e que se tornou uma das minhas melhores amigas. Deus a abençoe.

À Nidia Lucia Domingues Macedo: amiga, gentil, carinhosa e sempre disponível.

Aos Doutores Carlos José de Lima, Henrique Carvalho e Leandro Alves, e a Doutora Livia Moreira, que com seu saber e boa vontade contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta tese.

Ao Rodrigo Salas, pela amizade, conselhos, solidariedade e orientação na realização deste trabalho.

À Pablo Muñoz, por compartilhar seu conhecimento e me abrir as portas de seu laboratório.

Ao Álvaro Ardiles pela doação dos animais.

Ao Alejandro Weinstein, pela ajuda.

Ao René, *in memoriam*.

A Tatiana Guncay, Macarena Oyanedel, Makarena Lemus e Marvin Querales e Julio Sotelo.

Aos meus colegas da Escola de Engenharia Civil Biomédica da Universidade de Valparaíso.

À Universidade Anhembi Morumbi, e ao CAPES pela bolsa de Doutorado.

À Universidade de Valparaíso, e ao centro Gerópolis pelos recursos econômicos para este projeto.

Ao laboratório de fotometria e control de qualidade da "Pontificia Universidad Católica de Valparaíso" - Chile, especialmente aos doutores Ivan Koipaitic e Sebastián Fingerhuth.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização deste estudo.

FOTBIOMODULAÇÃO TRANSCRANIANA (FBMTC) APLICADA À DOENÇA DE ALZHEIMER – MODELO EM RATOS

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo que se caracteriza patologicamente pela presença de proteínas excessivas no cérebro, como o peptídeo beta amiloide e os emaranhados neurofibrilares TAU. Para o estudo da fisiopatologia da doença e o desenvolvimento de medicamentos associados à DA, é comum a utilização de modelos animais, principalmente camundongos. Um dos modelos frequentes para o estudo da DA é o do camundongo APP/PS1, pois seu genoma é homólogo em grande porcentagem ao do ser humano, expressando o transgene três vezes mais que outros modelos de DA sendo que deficiências fisiológicas começam após cinco meses. Até o ano 2020, o FDA tinha aprovado apenas quatro medicamentos que poderiam inverter a neurotransmissão da doença; contudo, estes medicamentos não previnem a perda neuronal, a atrofia cerebral e, conseqüentemente, o declínio cognitivo progressivo. Como resultado, outras alternativas não farmacológicas estão a emergir com crescente atenção, tais como a Fotobiomodulação Transcraniana (FBMTC), que tem como objetivo a entrega de radiação na região do vermelho ou do infravermelho próximo sobre o tecido cerebral. O foco desta terapia é tratar o estresse oxidativo mitocondrial que cria o ambiente para a produção de aglomerados neurofibrilares (NFTs) e proteínas A β , visando minimizar os danos cerebrais e melhorar as funções cognitivas. Considerando a elevada prevalência da DA no mundo, a oportunidade de aplicar uma terapia não invasiva, inovadora, segura e econômica em comparação com outros tipos de tratamentos, propomos neste trabalho avaliar o efeito da FBMTC sobre a doença de Alzheimer em modelo animal. Para esta finalidade um dispositivo óptico foi concebido utilizando um módulo com quatro LED's com potência óptica de 10,9 mW, e área de irradiação de 2,3 cm², emitindo radiação em 630 nm. O dispositivo foi projetado para entregar 4,74 mW/cm², os quais irradiando o tecido por 125 s, fornece uma densidade de energia de 0,59 J/cm². O protocolo experimental utilizou vinte e três camundongos que foram divididos em quatro grupos: o grupo transgênico com DA (grupo ALZ), o grupo transgênico com DA submetido a terapia (grupo ALZ+FBMTC), o grupo saudável (grupo WT) e o grupo saudável submetido a terapia (grupo WT+FBMTC). As funções cognitivas foram estimadas usando o Teste de Reconhecimento de Novos Objetos (NOR), que fornece os valores da taxa de reconhecimento e porcentagem da preferência por objetos; e parâmetros de plasticidade sináptica usando quatro variáveis eletrofisiológicas de sinapses colaterais hipocâmpais de Schaffer-CA1: potenciais de campo excitatórios (fEPSP), facilitação de pulso emparelhado (PPF), depressão a longo prazo (LTD) e potenciação a longo prazo (LTP). As medições mostraram que a FBMTC apresentou tendência de melhora da memória de reconhecimento em camundongos com DA ($p > 0,05$), enquanto que um efeito benéfico ($p < 0,05$) deste tratamento sobre a plasticidade sináptica foi demonstrado no modelo APP/PS1 utilizado. Estes resultados confirmam que a FBMTC pode ser uma alternativa de tratamento para a doença de Alzheimer. Embora os resultados do presente estudo sejam satisfatórios, são necessários mais pesquisas para determinar parâmetros mais acurados sobre a dosimetria.

Palavras-chave: Engenharia biomédica, fotobiomodulação transcraniana, doença de Alzheimer, eletrofisiologia, memória espacial e reconhecimento de objetos.

TRANSCRANIAL PHOTOBIO-MODULATION (PBMT) APPLIED TO ALZHEIMER'S DISEASE - MOUSE MODEL

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that is pathologically characterized by an excess of proteins in the brain, such as amyloid beta peptide and TAU neurofibrillary tangles. It is common to use animal models, mainly mice, to study the pathophysiology of the disease and the development of drugs associated with AD. One of the frequent models for the study of AD is the APP/PS1 mouse since its genome is homologous in large percentage to that of the human being, expressing the transgene three times more than other AD models, with physiological deficiencies starting after five months. By the year 2020, the FDA had approved only four drugs that could reverse the neurotransmission of the disease; however, these drugs do not prevent neuronal loss, brain atrophy, and, consequently, progressive cognitive decline. As a result, other non-pharmacological alternatives are emerging with increasing attention, such as Transcranial Photobiomodulation (FBMT), which aims to deliver radiation in the red or near-infrared region to brain tissue. This therapy aims to treat the mitochondrial oxidative stress that creates the environment for the production of neurofibrillary clusters (NFTs) and A β proteins, aiming to minimize brain damage and improve cognitive functions. Considering the high prevalence of AD in the world and the opportunity to apply a non-invasive, innovative, safe, and economical therapy compared to other types of treatments, we propose in this work to evaluate the effect of FBMT on Alzheimer's disease in an animal model. For this purpose, an optical device was designed using a module with four LEDs, each with 10,9 mW of optical power and an irradiation area of 2.3 cm², emitting radiation at 630 nm. The device is designed to deliver 4,74 mW/cm², which by irradiating tissue for 125 s, provides an energy density of 0,59 J/cm². The experimental protocol used twenty-three mice that were divided into four groups: the transgenic AD group (ALZ group), the transgenic AD group submitted to therapy (ALZ+FBMT group), the healthy group (WT group) and the healthy submitted to therapy (WT+FBMT group).. Cognitive functions were estimated using the New Object Recognition Test (NOR), which provides values for recognition rate and percentage of object preference; and synaptic plasticity parameters using four electrophysiological variables of Schaffer-CA1 hippocampal collateral synapses: excitatory field potentials (fEPSP), paired pulse facilitation (PPF), long-term depression (LTD) and long-term potentiation (LTP). Measurements showed that FBMT tended to improve recognition memory in AD mice ($p>0.05$), while a beneficial effect ($p<0.05$) of this treatment on synaptic plasticity was demonstrated in the APP/ PS1 used. These results confirm that FBMT may be an alternative treatment for Alzheimer's disease. Although the results of the present study are satisfactory, more research is needed to determine more accurate parameters on dosimetry.

Keywords: Biomedical engineering, transcranial photobiomodulation, Alzheimer's disease, electrophysiology, spatial memory and object recognition.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESE.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. REVISÃO DA LITERATURA	22
4.1 Epidemiologia e incidência da doença de Alzheimer (DA)	22
4.2 Doença de Alzheimer e mecanismos patogênicos	24
4.3 Doença de Alzheimer e regiões cerebrais afetadas em camundongos	26
4.4 Estudo de mecanismos celulares e memória em modelos animais	27
4.5 Modelos de camundongos transgênicos APP/PS1	28
4.6 Fotobiomodulação Transcraniana (FBMTC)	30
5. METODOLOGIA	33
5.1 Tipo de estudo	33
5.2 Animais	34
5.3 Dispositivo para FBMTC	36
5.4 Intervenções	41
5.5 Análise estatística	50
6. RESULTADOS	51
6.1 Resultados do experimento de memória de reconhecimento	51
6.2 Resultados dos experimentos de plasticidade sináptica	55
7. DISCUSSÃO	62
8. CONCLUSÃO	66

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Número estimado de pessoas com demência derivada da DA por 1.000 habitantes	23
Figura 2: Espectro de emissão do dispositivo óptico utilizado – pico centrado em 630 nm	36
Figura 3: Módulo LED's	37
Figura 4: Dispositivo óptico desenvolvido para irradiação transcraniana	38
Figura 5: Configuração do arranjo de medição óptica	39
Figura 6: Distribuição da intensidade de irradiação óptica	40
Figura 7: Protocolo de pesquisa	41
Figura 8: Esquema da avaliação da memória de reconhecimento de objetos (NOR)	43
Figura 9: Caixa de irradiação	45
Figura 10: Aplicação da Fotobiomodulação Transcraniana nos camundongos	46
Figura 11: Corte histológico transversal do hipocampo e formas características de um potencial excitatório extracelular pós-sináptico (fEPSP)	49
Figura 12: Resultado experimental do "teste de campo aberto"	52
Figura 13: Porcentagem de preferência por um objeto, para cada um dos grupos experimentais	54
Figura 14: Porcentagem de preferência do objeto B	55
Figura 15: Efeitos da FBMTC na transmissão sináptica basal em sinapses hipocampais colaterais de Schaffer-CA1	56
Figura 16: Efeitos do FBMTC sobre a facilitação de pulso emparelhado (PPF) medidas em sinapses hipocampais CA3-CA1.....	57
Figura 17: Aumento da potencialização de longo prazo (LTP) na via colateral Schaffer-CA1 de camundongos ALZ submetidos ao FBMTC	59
Figura 18: Expressão alterada da depressão sináptica de longo prazo (LTD)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de morbidade e mortalidade de pessoas hospitalizadas com DA entre 2008 e 2018 no Brasil	24
Tabela 2: Classificação dos animais de acordo com o seu estado e tratamento	35
Tabela 3: Classificação dos animais de acordo com o seu estado e tratamento depois de contabilizar mortes e perdas cerebrais	36
Tabela 4: Características técnicas do módulo LED utilizado na implementação do dispositivo óptico	37
Tabela 5: Parâmetros de tratamento da FBMTc	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 - Objeto familiar 1
A2 - Objeto familiar 2
A3 - Objeto familiar 3
AchE - Enzima acetilcolinesterase
ACSF - Líquido cefalorraquídeo artificial
ADI - Associação Mundial de Alzheimer
ALZ – Alzheimer
ALZ+ FBMTc - Alzheimer com fotobiomodulação transcraniana
AP-1 - Grupo de proteínas que ajudam a controlar funções na célula
APP - Proteína precursora do amiloide
APP - Proteína precursora do amiloide
ATN - TAU fibrilar e neurodegeneração
A β - Beta amiloide
A β - Beta amiloide
B - Objeto novo
C57BL - Camundongos tipo *Wild Type*
CA1 - Região 1 do Chifre Ammonis
CA2 - Região 2 do Chifre Ammonis
Ca²⁺ - Ion de cálcio
CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
CBIA - Comité de Bioética animal
CCO - Citocromo C oxidase
Cm - Centímetro
CO₂ - Dióxido de carbono
DA - Doença de Alzheimer
DA - Doença de Alzheimer
DG - Giro dentado
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNAm - DNA mitocondrial

EUA - Estados Unidos de América
FBMTC - Fotobiomodulação transcraniana
FBMTC - Fotobiomodulação transcraniana
FDA - *Food and Drug Administration*
FDA - *Food and Drug Administration*
fEPSP - Potenciais de campo excitatórios
FV - *Fiver volley*
FWHM - Largura a meia altura
Hz - HerzDA - Doença de Alzheimer
I/O - *Input - Output*
J - Julios
KCl - Cloreto de Potássio
L166P – Gen mutante associado à idade
LED - *Light Emitting Diode*
LTD - Depressão a longo prazo
LTP - Potenciação a longo prazo
MgCl₂ - Dicloreto de Magnésio
ms - Mili segundos
MΩ – Megaohmnios
NaH₂PO₄ - Bifosfato de Sódio
NaHCO₃ - Cloreto de Potássio
NF-κB - Grupo de proteínas que ajudam a controlar funções na célula
NFT - Aglomerados neurofibrilares
Nm - Nanômetro
NMDA - N-Metil-D-aspartato
NO - Óxido nítrico
NOR - *Novel Object Recognition*
O₂ – Oxigênio
OMS - Organização Mundial da Saúde
Open field - Teste de campo aberto
PPF - Facilitação de pulso emparelhado

PS - Presenilina

PS1 - Presenilina 1

PS1 - Presenilina 1

s - Segundos

S. Radiatum - Stratum radiatum

SC - Colaterais de Schaffer

TAU - Proteína de ligação à tubulina

TAU - Proteína de ligação à tubulina

TBS - *Theta burst*

Tof - Tempo de exploração do objeto familiar

Ton - Tempo de exploração do novo objeto

W – Watts

WT - Wild Type

WT+ FBMTc - Wild Type com fotobiomodulação transcraniana

β – Beta

μ A - Micro amperes

FOTOBIMODULAÇÃO TRANSCRANIANA (FBMTC) APLICADA À DOENÇA DE ALZHEIMER – MODELO EM RATOS

1. INTRODUÇÃO

A motivação para o desenvolvimento desta tese de doutorado deriva de duas questões que estão começando a ganhar relevância global:

- A primeira delas é o aumento exponencial da doença de Alzheimer (DA), que é um distúrbio neurodegenerativo comum crônico progressivo que lentamente leva à demência (XIAO et al., 2017). Embora todas as razões pelas quais ela se desenvolve ainda não sejam compreendidas, a pesquisa proporciona uma melhor compreensão de quais fatores expõem o indivíduo a um risco maior, entre os quais podemos citar: idade, diabetes, deficiência cognitiva leve, doença cardiovascular e traumatismo craniano, entre outros (PEÑA, 1999). Estima-se que até 2050 poderá haver 152 milhões de pessoas acometidas por essa doença (GAUTHIER, et al., 2022).
- A segunda delas é baseada em avanços no campo da tecnologia que criaram diferentes perspectivas para o tratamento de doenças neurodegenerativas (como a DA); sendo que uma delas, a fotobiomodulação transcraniana pode ser aplicada sobre a calota craniana e ser absorvida pelo tecido neural, gerando três tipos de respostas: neuroquímica, neurobiológica e modulação da rede neural (DE SOUSA, et al., 2019). A FBMTC é uma modalidade de terapia de radiação na região do vermelho ou do infravermelho próximo sobre o tecido cerebral, que atua na cadeia respiratória mitocondrial dos neurônios corticais (JOHNSTONE et al., 2016), sendo que estudos de seus efeitos foram realizados em modelos DA em ratos, e ensaios controlados aleatórios em humanos. Resultados demonstraram que se trata de um novo tratamento, não invasivo,

capaz de mitigar doenças neurodegenerativas progressivas, seguro e mais econômico do que outros tratamentos realizados na DA (BUENDIA, et al., 2022).

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência em todo o mundo (VAZ, et al., 2020). Esse transtorno neurodegenerativo heterogêneo aparece em cerca de 35% das pessoas com mais de 85 anos e afeta mais de 5 milhões de pessoas nos Estados Unidos (HAINES, 2018), com incidência e prevalência de 5% na Europa, atingindo cerca de 12,33 por 1.000 pessoas/ano (NIU, et al., 2017). Na América Latina, a prevalência da demência é de 7,1%, sendo a DA o tipo mais frequente (CUSTODIO, et al., 2017). Condições como idade, sexo feminino, diabetes, pressão alta, inatividade física, tabagismo e a inatividade mental, juntamente com as condições genéticas, foram identificadas como os principais fatores de risco (MIELKE, et al., 2014; ABNER, et al., 2017; FRIGEIRO, et al., 2019; GOTTESM, ET AL., 2017; CROUS, et al., 2017).

O diagnóstico da DA vem evoluindo ao longo do tempo, passando de critérios puramente patológicos para clínicos, avançando para uma categorização baseada em biomarcadores biológicos (JACK, et al. 2018). Essa evolução permitiu o desenvolvimento de um sistema combinado que classifica a progressão e gravidade da doença por meio de biomarcadores e o grau de comprometimento cognitivo, dentro do que, hoje conhecemos como continuum (JICHA, et al., 2010; SARAH, et al. 2014), que se inicia antes do aparecimento dos sintomas e se desenvolve por um longo período (VILLEM, et al., 2011; VILLEM, et al., 2013), variando de cognitivamente normal ao comprometimento cognitivo leve ou demência.

Os sintomas clínicos são caracterizados por prejuízo precoce na aprendizagem e memória, com deficiências posteriores observadas na função executiva, atenção complexa, linguagem, função visuoespacial, praxia, gnose e comportamento (LONG, et al., 2019). Uma vez que os sintomas cognitivos observados clinicamente nem sempre são específicos da DA (SERRANO, et al., 2014), um sistema flexível de classificação para biomarcadores que definem a DA

como Amiloide, TAU fibrilar e neurodegeneração (ATN), foi desenvolvido, incluindo fluido e imagem onde os biomarcadores podem ser adicionados (TÖRÖK, et al., 2020). Este sistema ATN apoia a importância da A β e da TAU como característica definidora da DA, reconhecendo que esses marcadores podem estar presentes em muitas outras patologias (JACK, et al. 2018). Embora a patogênese da doença ainda não esteja bem definida, tem-se argumentado que há um desequilíbrio nos mecanismos de controle da proteostase, que pode funcionar como um gatilho (JEVTIC, et al., 2017). Essa alteração pode resultar no acúmulo patológico de proteínas no cérebro, como peptídeo A β e emaranhados neurofibrilares TAU, iniciando uma cascata de eventos de neurotoxicidade generalizada, incluindo estresse oxidativo, inflamação local e hiperfosforilação. Essa cascata de eventos produz desequilíbrio entre os vários neurotransmissores, como acetilcolina, dopamina ou serotonina, o que pode causar um déficit na transmissão sináptica (YIANNPOUBO, et al., 2020), levando a uma deficiência na plasticidade sináptica, que é a capacidade dos neurônios de modificar a quantidade, a estrutura e as funções das sinapses ao longo do tempo, como por exemplo, a potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), entre outros (CHEN, et al., 2019).

A disfunção sináptica tem sido evidenciada principalmente no hipocampo e córtex, que estão associados aos déficits cognitivos observados na DA (LI, et al., 2018). Com base na possível etiologia, a partir de 2020, o *Food and Drug Administration* (FDA) tem aprovado quatro medicamentos para o tratamento da DA (CUMMINGS, et al., 2019). Esses medicamentos são usados para neutralizar o desequilíbrio de neurotransmissores observados na doença: donepezil, galantamina e rivastigmina atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) e memantina como antagonista do receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA). No entanto, essas drogas não previnem a perda neural, a atrofia cerebral e, conseqüentemente, o declínio cognitivo progressivo observado em pacientes com DA (MIZIAK, et al., 2021). Um novo medicamento para tratar a DA é baseado em uma redução significativa da placa A β no cérebro, o Aduhelm (aducanumab), foi aprovado pelo FDA, mas com grande controvérsia (KNOPM, et al., 2019), devido

a ocorrência de alguns efeitos colaterais, identificados a partir do estudo de imagens diagnósticas, entre eles: anormalidades de imagem relacionadas a amiloide com edema, onde há inchaço no cérebro, anomalias de imagem relacionadas com amiloide com depósitos de hemossiderina, incluindo pequenas hemorragias no cérebro e sangramento na superfície do cérebro (PRUTHI, et al., 2022).

Como consequência, o uso de alternativas não farmacológicas estão surgindo e recebendo cada vez mais atenção, sendo que uma das alternativas disponíveis é a fotobiomodulação transcraniana (FBMTC), que envolve a irradiação do cérebro com luz na região espectral do vermelho ou infravermelho próximo (RAMEZANI, et al. 2021). O foco desta terapia é reduzir o estresse oxidativo mitocondrial que cria o ambiente para a produção de NFTs e proteínas A β .

Diferentes fontes de luz têm sido usadas para a FBMTC, como lasers e diodos emissores de luz (LEDs). Evidências sugerem que os LEDs funcionam tão bem quanto os lasers, com vantagens de serem de menor custo e de melhor adequação para uso doméstico (HAMBLIM, 2019). Estudos anteriores usando modelos animais e humanos mostraram os efeitos benéficos do FBMTC na DA. Em modelos animais de DA, o efeito mais comum é a redução das placas amilóides por uma diminuição na neuropatologia do peptídeo A β (HU, et al., 2018; PURUSHOTHUM, et al., 2014; De TABOADA et al., 2019; Da LUZ, et al., 2017).

Em humanos, a FBMTC induziu efeitos neurocognitivos benéficos, como foi observado em idosos ao realizar a tarefa de vigilância psicomotora, atenção sustentada e tarefa de memória (VARGAS, et al., 2017). Além disso, o tratamento com FBMTC melhorou as habilidades cognitivas em uma pequena amostra de pacientes com DA (SALTM, et al., 2017; BERM et al., 2017; LIM, 2018). Embora existam evidências mostrando que FBMTC aumentou a plasticidade sináptica em casos de transtornos depressivos (KUHN, et al., 2014), acidente vascular cerebral (FELLING, et al., 2015) e traumatismo cranioencefálico (TOM, et al., 2014), há poucos estudos abordando doenças neurodegenerativas como a DA. Isso deve ser destacado, pois, se a FBMTC permite restaurar a transmissão sináptica

excitatória no hipocampo de indivíduos com DA, e isso, por sua vez, tem um impacto positivo nas funções cognitivas do paciente, a FBMTC pode ser uma boa opção de tratamento não invasivo (BUENDÍA, et al., 2022, JARA, et al., 2021, ZHANG et al., 2020, COMEROTA et al., 2017).

Com base nas características gerais da doença de Alzheimer e dos elementos favoráveis da fotobiomodulação transcraniana (FBMTC), a presente tese de doutorado procura demonstrar o efeito da FBMTC nos elementos biológicos do cérebro associados ao hipocampo, que é considerado crítico na memória. O hipocampo é uma estrutura na qual a neuroplasticidade foi observada, definida como a capacidade dos neurônios (de estímulos externos e internos) de se adaptar para formar novas redes em resposta ao desenvolvimento e aprendizagem do cérebro (CASTRÉN, et al., 2017). Entretanto, assim como apresenta um alto grau de plasticidade, também é altamente vulnerável à condições prejudiciais como neuroinflamação, estresse oxidativo, envelhecimento e neurodegeneração (BARTSCH, et al., 2015). Para determinar o efeito da FBMTC no modelo selecionado de doença de Alzheimer, a FBMTC foi utilizada em camundongos WT saudáveis e no modelo de DA APP/PS1 (de nove meses de idade). Tanto os elementos biológicos do cérebro foram analisados por meio de experimentos eletrofisiológicos, bem como fatores de memória de reconhecimento de objetos aplicando NOR, ambos associados com o hipocampo.

2. HIPÓTESE

Com a DA, o hipocampo apresenta alterações neurobiológicas incluindo aumento do estresse oxidativo, vias de sinalização intracelular alteradas, comprometimento sináptico, comprometimento de organelas e disfunção mitocondrial (JARA, et al., 2021). Por essa razão a busca por novas terapias não invasivas, seguras e de baixo custo, focadas em preservar ou atenuar o comprometimento da memória hipocampal relacionado à DA pode ter impacto no tratamento da doença. A FBMTc aplicada em diversos estudos experimentais e clínicos vem demonstrando resultados promissores na melhoria da função cerebral de camundongos transgênicos, melhorando sua memória espacial (SALEHPOUR F., et al., 2017). Também em camundongos transgênicos a FBMTc de corpo inteiro foi capaz de restaurar o fluxo de fluido intersticial, reduzindo a deposição de A β no cérebro e aliviando déficits cognitivos (YUE., 2019).

Com base no acima exposto nos permitimos afirmar que a plasticidade sináptica e a memória de reconhecimento associada ao hipocampo afetada pela DA podem ser estimuladas pela FBMTc.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da FBMTc no comprimento de onda de 630 nm, potência óptica de 10,9 mW, densidade de potência de 4,77 mW/cm², densidade de energia de 0,54 J/cm², sob os aspectos relativos à memória de reconhecimento e à plasticidade sináptica de um modelo animal adaptado para a doença de Alzheimer.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as capacidades cognitivas de camundongos tipo WT e transgênicos APP/PS1 submetidos a FBMTc por meio da análise de memória de reconhecimento, aplicando NOR;
- Avaliar a plasticidade sináptica de camundongos tipo WT e transgênicos APP/PS1 submetidos a FBMTc por meio da análise da eletrofisiologia cerebral, analisando estudos de registro de campo.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Epidemiologia e incidência da doença de Alzheimer (DA)

Segundo Dadalto, et al., (2021), um levantamento realizado pela OMS no ano de 2015 evidenciou que os 9 países com o maior número de pessoas com DA eram: China (5,4 milhões), EUA (3,9 milhões), Índia (3,7 milhões), Japão (2,5 milhões), Alemanha (1,5 milhões), Rússia (1,2 milhões), França (1,1 milhões) e Brasil (1 milhão) (DADALTO, et al., 2021). De acordo com um relatório da Associação Mundial de Alzheimer (ADI 2015), estima-se que um novo caso de DA ocorra a cada 3,2 segundos no mundo e calcula-se que até 2050 haverá um novo caso a cada segundo. Estima-se que o número total de pessoas com DA atinja 82 milhões até 2030 e 152 milhões até 2050. Segundo uma estimativa da *Alzheimer's Disease International*, em 2010 o custo global da doença foi de 604 milhões de dólares e em 2015 de 818 milhões de dólares, representando um aumento em cinco anos de 35% (GARRE, 2018). Os casos de demência associada à DA estão aumentando em todo o mundo e, em muitos países, o número pode dobrar nos próximos 30 anos (figura 1), e espera-se que triplique até 2050 nos países latino-americanos Chile, Brasil, Colômbia e México (ROA, 2022).

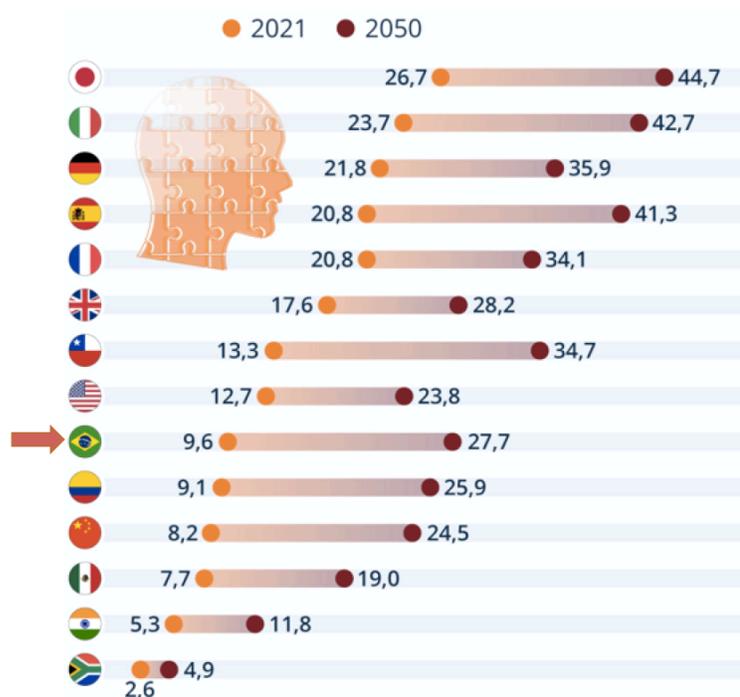


Figura 1: Número estimado de pessoas com demência derivada da DA por 1.000 habitantes. Fonte: ROA, 2022.

A prevalência da doença de Alzheimer no Brasil para a população acima de 65 anos de idade é de 12% (DADALTO, et al., 2021). Para estudos envolvendo a população brasileira em geral há uma grande variabilidade nas estimativas, pois três estudos relatam que a prevalência foi de 2%, 7,1% e 8,8% (KEMPEL, et al., 2018). No Brasil entre 2010 e 2019, 164.975 pessoas morreram de DA; sendo que em 2019 o número de óbitos foi de 23.150, correspondendo a um aumento de 133,54% na referida década (FERREIRA, et al., 2021). Um estudo conduzido por DADALTO et al., (2021) evidenciou uma alta taxa de morbidade e mortalidade conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Taxa de morbidade e mortalidade de pessoas hospitalizadas com DA entre 2008 e 2018 no Brasil.

Variáveis	Faixa etária	40 a 49 anos	50 a 59 anos	60 a 69 anos	70 a 79 anos	80 anos e mais
Média de hospitalizações		10	31,36	108	342,63	612,54
Tempo médio de permanência		36,2	35	39,7	26,6	25,1
Média de morte		1,33	2,7	14	50,09	124,90
Taxa de mortalidade por 100.000 habitantes		7,27	7,82	12,96	14,61	20,39

Fonte: DADALTO, et al., 2021

Por outro lado, a doença de Alzheimer gera custos consideráveis tendo atingido no Brasil em 2018/pessoa, o valor de R\$13.468,80 para formas leves, R\$18.106,80 para formas moderadas e R\$19.736,00 para formas graves (KEMPEL, et al., 2018). De acordo com Ferreira et al., (2021) a implementação de metodologias para o acompanhamento da DA no país permitirá implementar políticas públicas mais eficientes de âmbito nacional com o intuito de diminuir a taxa de mortalidade e otimizar as notificações sobre mortes por DA no Brasil, fornecendo uma melhor compreensão sobre a dinâmica da doença no país (FERREIRA, et al., 2021).

4.2 Doença de Alzheimer e mecanismos patogênicos

A etiologia da doença de Alzheimer é heterogênea, existindo causas genéticas, não genéticas e ambientais, e em alguns casos resultantes de uma combinação de vários fatores, sendo que um pequeno número de casos está relacionado a mutações nos cromossomos 1, 14 e 21. Apesar da diversidade de causas que podem gerar DA, estudos múltiplos mostram a ativação de uma sequência de eventos bioquímicos que levam a uma alteração das células cerebrais, à perda de suas conexões e à sua morte (PEÑA, et al., 1999, KNOPMAN, et al., 2019).

Alguns neuropatologistas estabeleceram uma definição de Alzheimer baseada inteiramente na carga de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares que subsidiam as anormalidades encontradas nas células cerebrais (KNOPMAN, et al., 2019), sendo essas:

- **Proteínas precursoras da amilóide, peptídeo A β e formação de placas:** A teoria mais amplamente aceita nos últimos anos é a chamada "cascata amilóide", que estabelece o depósito extracelular de β -amilóide formando placas como um fenômeno patológico central. Isto levaria posteriormente a danos axonais através de processos inflamatórios, alteração na estrutura do citoesqueleto microtubular neuronal e o aparecimento de alterações neurofibrilares e neurodegenerativas, com o resultado de morte celular (ALVAREZ, et al., 2020). O caminho metabólico que leva à deposição de β -amilóide envolve a clivagem da proteína precursora da amilóide (APP), uma proteína transmembrana, pela ação das enzimas β -secretase. Este processo dá origem à β -amilóide insolúvel que é posteriormente depositada extracelularmente, dando origem a placas neuríticas (HARDI, et al., 2002). As placas senis consistem em corpos extraneuronais, maiores que os corpos neuronais, de forma esférica, formados por β -amilóide cercado por formações neuríticas anormais, tais como dendritos e pequenos axônios degenerados, associados a astrócitos e microglia ativada (REINALDO, et al., 2008).
- **Emaranhados neurofibrilares e proteína:** Os emaranhados neurofibrilares são formações proteicas intracelulares que ocorrem em neurônios corticais e límbicos. As proteínas envolvidas, incluindo a proteína TAU associada ao microtubo neuronal estão fosforiladas de forma anômala, resultando na formação de filamentos helicoidais emparelhados insolúveis (RIBE, et al., 2005).
- **Estresse oxidativo e mitocôndria:** O estresse oxidativo é conhecido por desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença de Alzheimer. Os radicais livres em excesso, peroxidam a

membrana lipídica, oxidam as proteínas e conseqüentemente danificam a membrana plasmática e as proteínas do citoesqueleto, além de afetar o RNA e o DNA nuclear. No cérebro, o intenso processo metabólico, as baixas concentrações de glutathiona e catalase e o aumento da proporção de ácidos graxos polinsaturados tornam o tecido cerebral altamente suscetível a danos oxidativos (GARY, et al., 2005).

A mitocôndria constitui um dos compartimentos celulares mais suscetíveis a danos oxidativos. Em particular, o DNA mitocondrial (DNAMt), devido a sua proximidade com a cadeia de transporte de elétrons, falta de histonas de proteção e de mecanismos eficientes de reparo, é um alvo potencial para o impacto das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DEMENTIA RESEARCH GROUP, 2000). A respeito disso, foram observados altos níveis de mutação do DNAMt no lóbulo temporal de pacientes com DA, que por sua vez mostraram altos níveis de dano oxidativo. A toxicidade do peptídeo amilóide envolve diretamente a mitocôndria e sua agregação aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} e NO em astrócitos (YAN, et al. 2005).

4.3 Doença de Alzheimer e regiões cerebrais afetadas em camundongos

Na DA existem anormalidades cerebrais que afetam seletivamente regiões específicas, em particular o neocórtex, área entorrinal, núcleo amigdalóide, núcleo basal, hipocampo, tálamo anterior e vários núcleos monoaminérgicos no tronco cerebral (KANDEL, et al., 2001). Em regiões danificadas, a disfunção e a morte dos neurônios estão associadas a anormalidades do citoesqueleto e reduzem os níveis de proteína sináptica nas regiões do cérebro para onde os neurônios se estendem (PROAÑO, et al., 2004). Na área do córtex e entorrinal, as células mais afetadas são os neurônios piramidais glutamatérgicos, e no neocórtex os interneurônios também degeneram. Da mesma forma, no hipocampo e, em particular, nas regiões CA1 e CA2, os neurônios piramidais são danificados

seletivamente. Os neurônios colinérgicos no núcleo basal, o núcleo septal interno e a banda diagonal de Broca, que fornecem as principais vias colinérgicas para o neocórtex e hipocampo, degeneram, reduzindo o nível de acetilcolina e marcadores colinérgicos nas áreas-alvo destas células (KANDEL, et al., 2001). Outros neurônios afetados são aqueles em núcleos específicos do núcleo amigdalóide, o núcleo anterior do tálamo, o locus ceruleus e os núcleos do Rafe, cujas lesões têm profundas consequências clínicas. As anormalidades do córtex entorrinal, o hipocampo e outros circuitos do córtex temporal interno são considerados fatores decisivos para a perda de memória e desatenção em DA (PEÑA, 2021).

4.4 Estudo dos mecanismos celulares de plasticidade e memória em modelos animais

Diferentes ferramentas são utilizadas para demonstrar mudanças na neuroplasticidade e na memória.

- No caso da neuroplasticidade, é utilizada a eletrofisiologia, que é o estudo das propriedades elétricas das células e tecidos biológicos. Inclui medições de mudanças de voltagem ou corrente elétrica em uma grande variedade de escalas. Em neurociência, isto inclui medições da atividade elétrica dos neurônios e particularmente do potencial de ação, que pode revelar aspectos da cognição como linguagem, consciência, memória, entre outros (MASSIMO, et al., 2009). Mais especificamente, a eletrofisiologia é uma forma experimental de avaliar a atividade neuronal e a eficácia sináptica através da aplicação de uma série de protocolos padronizados: Potenciação de Longo Prazo (LTP) e Depressão de Longo Prazo (LTD), utilizadas para o estudo da plasticidade sináptica, assim como protocolos como Facilitação de Pulso Emparelhado (PPF) e *Input - Output* (I/O), utilizadas no estudo da transmissão sináptica (SORIANO, et al., 2007).

- Para o caso da memória, especialmente a memória de reconhecimento, são analisadas tarefas de navegação espacial, por exemplo, com *Novel Object Recognition* (NOR) (WIMMER, 2012, et al.; DENNINGER, et al., 2018) que envolve a memória de um objeto familiar em paralelo com a detecção e codificação de um novo objeto (ENNACEUR, 2010). Assim, o sujeito experimental se sentirá atraído com mais frequência para o novo objeto e dedicando mais tempo para sua exploração se comparado com o objeto familiar. Esta aparente "preferência" pelo novo objeto é considerada como uma indicação de que existe uma representação do objeto familiar na memória, ou seja, eles o lembram (DERE, et al., 2007; ARIAS, et al., 2015; BLASER, et al., 2015; DIX, et al., 1999). Devido ao tempo em que o procedimento é realizado, cria-se a possibilidade de os camundongos adquirirem estratégias indesejadas para auxiliar na execução da tarefa (DIX, et al., 1999), porém, Ennaceur (2010) afirma que como esta tarefa aproveita uma preferência espontânea, não requer aprendizagem de regras e, portanto, muito pouco treino prévio e o facto de os camundongos não necessitarem de ser ensinados, se reduz um potencial fator de confusão, ou seja, a capacidade do animal para aprender ou executar a regra de desempenho (ENNACEUR., 2010).

4.5 Modelo de camundongos transgênicos APP/PS1

Um modelo experimental pode ser definido como uma representação de um conjunto de características que permitem uma melhor compreensão de uma situação real, quando não é possível trabalhar diretamente com essa realidade (RAE, 2019). Este é o caso das patologias em que animais geneticamente modificados ou inoculados são frequentemente utilizados para expressar a condição a ser estudada. O ponto de partida vem do desenvolvimento da tecnologia transgênica, e mais especificamente dos camundongos transgênicos (YUNLONG, 2013). Existe uma grande variedade de modelos animais

(invertebrados, primatas, cães, entre outros) e modelos celulares frequentemente utilizados em pesquisas, mas a maior parte do trabalho baseado em modelos animais é realizado em camundongos, pois eles são um homólogo humano em 99% do genoma (AHMAD, et al., 2003).

Existem vários modelos experimentais de DA que tentam reproduzir alguns dos sinais e sintomas conhecidos da doença, mas um modelo experimental que integra todos os aspectos da DA não foi desenvolvido, e é precisamente isso que predispõe o pesquisador a usar um modelo ou outro para reproduzir uma condição humana (MUÑOZ, 2012). Outro fator limitante é a complexidade do trabalho com animais transgênicos em função da dificuldade de reprodução e seu alto custo de manutenção, e por outro lado, dada sua condição, eles exigem uma série de cuidados mais rigorosos do que um animal saudável, uma vez que apresentam uma vida curta e a implicação de função mental inferior (MANZANO, et al., 2009).

Múltiplas investigações científicas determinaram que as principais proteínas precursoras da DA são, as presenilina 1 e 2, e a TAU, justificando a existência de diferentes modelos animais tais como, aquele baseado no metabolismo da proteína precursora amilóide (APP), outros baseados na presenilina (PS), APP/PS mutantes duplos, outros baseados na proteína TAU e o triplo transgênico PS/APP/TAU (MANZANO, et al., 2009). Um dos modelos experimentais frequentemente utilizados é o APP/PS1 duplo transgênico.

Os camundongos com a mutação APP/PS1 duplo transgênico, contém transgenes humanos tanto para o APP portador da mutação sueca quanto para o PS1 contendo uma mutação L166P, ambos sob o controle do promotor Thy1. Nesses camundongos, a expressão do APP transgene humano é aproximadamente 3 vezes maior do que o APP murino endógeno. O depósito de placas amilóides começa no neocórtex, aproximadamente na sexta semana de idade (MANZANO, et al., 2009). Os depósitos aparecem no hipocampo em aproximadamente três a quatro meses, e no estriato, tálamo e tronco cerebral em quatro a cinco meses (SANCHEZ, 2015). Pesquisas desenvolvidas para

caracterizar esses camundongos mostraram uma aprendizagem deficiente em tarefas de labirinto espacial recompensado com alimento no oitavo mês de idade; outras observações sugerem deficiências cognitivas, incluindo déficits no labirinto de *Morris Water* no sétimo mês de idade. As alterações na LTP na região CA1 do hipocampo também foram relatadas, tendo se iniciado por volta do sétimo mês (GENGLER, et al., 2010). Estes animais não mostram nenhuma perda neuronal global, mas perda moderada de neurônios na camada celular granular do giro dentado e outras sub-regiões com alta densidade neuronal em idades mais avançadas (17 meses) (SANCHEZ, 2015).

4.6 Fotobiomodulação Transcraniana (FBMTC)

Nas últimas duas décadas, a FBMTC tem sido introduzida como uma modalidade inovadora para o estímulo da atividade neural com o objetivo de melhorar a função cerebral (SALEHPOUR, et al., 2018). Esta técnica baseada na luz envolve a exposição do tecido neural à radiação de baixa potência com comprimentos de onda operando na região vermelho e infravermelho próximo (600 nm a 1100 nm) (HENNESSY, et al., 2017, HAMBLIN, et al., 2016). Na aplicação da FBMTC vários parâmetros devem ser controlados para que se possa obter os melhores resultados, tais como: comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, número de repetições, duração do tratamento e modo de entrega da luz, que pode ser contínua ou pulsada (CHEN, et al., 2011, McCARTHY, et al., 2010).

A FBMTC é uma modalidade de terapia que se propaga através da caixa craniana atingindo o tecido cerebral (ZHANG, et al., 2020), normalmente são utilizados dispositivos ópticos que podem ser LEDs ou Laser, com potência típica variando entre 1 e 10 W. (SALEHPOUR, et al., 2018).

Desde o advento da FBMTC no campo da ciência médica, uma grande variedade de fontes de luz e seus efeitos sobre os tecidos tem sido avaliada. A luz LED apresenta maior largura espectral se comparada com a luz Laser, apesar

disso, sua aplicação na FBMTc em nada é prejudicada pois em processos terapêuticos uma maior largura de faixa pode ser interessante uma vez que cromóforos alvo presentes no tecido apresentam absorção em comprimentos de onda diferentes, porém próximos entre si. Outro aspecto importante da luz LED é a sua grande abertura numérica permitindo obter uma radiação de luz difusa sobre grandes áreas de superfície, produzindo pouco calor e reduzindo gastos com energia, sendo considerado seguro pelo FDA (SALGADO, et al., 2015).

Embora haja controvérsia sobre a penetração da luz no tecido, foram feitas medições que mostram que a luz passa pelo cabelo e pelo osso. Por exemplo, Purushothuman et al. (2014) indicaram que aproximadamente 2,5% da luz transmitida atinge o córtex cerebral. Por sua vez, De Taboada, et al. (2019) afirmaram que a penetração da luz no crânio de um camundongo é ≈ 2 mm -800 nm- e ≈ 10 mm -830 nm- no crânio de um cadáver humano (PURUSHOTHUMAN et al., 2014). Além disso, Henderson et al. (2019) apontaram que nenhuma energia de fóton atinge uma profundidade de 3 cm, porém gera um efeito sistêmico através de uma rede padrão que ativa mecanismos moleculares em neurônios localizados em áreas mais profundas do cérebro (HENDERSON., 2019).

Em busca de alternativas para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a literatura tem mostrado bons resultados obtidos com a FBMTc devido à sua capacidade de proporcionar ao organismo uma melhor resposta inflamatória, cerebrovascular e fornecer biomodulação celular (LINS, et al., 2010). Seus efeitos benéficos foram observados em uma variedade de situações clínicas, com resultados satisfatórios observados em lesões cerebrais (HAMBLIN M, et al., 2016, HAMBLIN M., 2019).

A FBMTc estimula, regenera e protege o tecido cerebral em fase de degeneração, atuando também na prevenção (QUIRK, et al., 2012). Seus mecanismos de ação são ativados quando a radiação é absorvida pelo citocromo C oxidase (CCO) na cadeia respiratória mitocondrial dos neurônios corticais. A sinalização celular e as moléculas mensageiras são reguladas como resultado da atividade mitocondrial estimulada, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS),

óxido nítrico (NO) e adenosina trifosfato (ATP). Essas moléculas sinalizadoras ativam fatores de transcrição incluindo NF- κ B e AP-1 que ao permearem o núcleo ativam a transcrição de uma gama de novos produtos gênicos. Essas alterações podem levar à diminuição da apoptose neuronal, excito-toxicidade e inflamação podendo contribuir para a redução do progressivo dano cerebral (HUANG, et al., 2012).

Hamblin (2018), estudou os mecanismos de ação da FBMT e entre eles destacou: efeitos mitocondriais relacionados ao CCO; espécies reativas de oxigênio ativando NO e fluxo sanguíneo; canais de cálcio sensíveis à luz; e sinalização e ativação de fatores de transcrição (HAMBLIN, et al., 2018), entre outros. Dentre os vários processos que beneficiam o tratamento de distúrbios cerebrais podemos citar a estimulação de curto prazo (ATP, fluxo sanguíneo, fluxo linfático, oxigenação cerebral, edema reduzido), o de neuroproteção (regulação de proteínas anti-apoptóticas, reduzida excito-toxicidade, maior liberação de antioxidantes, e menor inflamação), e finalmente, processos voltados para a reparação cerebral (neurotrofinas, neurogênese e sinaptogênese) (HAMBLIN, et al., 2016). Ando, et al., (2011) afirmam que uma breve exposição à FBMT, especialmente no caso de animais experimentais que sofreram algum tipo de lesão aguda ou agressão traumática, pode ter efeitos que duram dias, semanas ou inclusive meses (ANDO, et al., 2011).

5. METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Nesta tese de doutorado foi realizado um estudo pré-clínico, quantitativo correlacional e coorte prospectiva voltada para avaliar o efeito da fotobiomodulação transcraniana (FBMTC) em um modelo murino transgênico portador da doença de Alzheimer sob a memória de reconhecimento e plasticidade sináptica associada ao hipocampo.

A proposta metodológica baseia-se nas definições dadas por Zúrita, et al., (2019) sobre "fases clínicas para o desenvolvimento de medicamentos", Sampieri, et al., (2014) sobre "âmbitos de investigação" e Salazar, et al., (2019) sobre "estudos de coorte"; onde declaram que:

- Um estudo pré-clínico ou fase pré-clínica de um estudo é o resultado experimental sobre a eficácia e tolerância no modelo animal (*in vivo*) de um novo tratamento que apoia a sua investigação subsequente em humanos (Zúrita, et al. 2019).
- Um estudo correlacional quantitativo é aquele em que são realizadas experiências em que as variáveis são medidas e associadas, as hipóteses são suportadas, e as relações entre estas variáveis são previstas e quantificadas (Sampieri, et al. 2014).
- Um estudo de coorte prospectivo é um estudo longitudinal, observacional e analítico em que a coorte se refere a um grupo que partilha uma característica previamente definida sendo acompanhada ao longo do tempo (Salazar, et al. 2019).

Esta metodologia foi estabelecida considerando parâmetros anteriormente definidos, onde se destaca que os estudos de campo utilizando a eletrofisiologia são utilizados para medir a plasticidade sináptica

no hipocampo, e isto só pode ser realizado com cortes histológicos cerebrais correlacionando a sinapse com a memória associada ao hipocampo.

Neste caso, foram selecionados camundongos com a doença de Alzheimer APP/PS1, uma vez que o seu genoma é homólogo em numa grande porcentagem ao dos humanos. Este modelo pré-clínico expressa também, o transgene 3 vezes mais do que outros modelos, e as deficiências neuro-cognitivas e fisiológicas podem ser observadas a partir dos 5 meses de idade.

Em relação às medições efetuadas, LTP, LTD, PPF e I/O são variáveis de plasticidade sináptica relacionadas com a porcentagem de preferência de um novo objeto pelos camundongos com AD, sendo que está associada à memória de reconhecimento.

5.2 Animais

Todos os experimentos foram realizados em camundongos transgênicos para a DA (APP/PS1) que foram comparados a um grupo controle de camundongos tipo C57BL/*Wild Type* (WT), ambos os grupos com 9 meses de idade e cabelo preto. Os reprodutores de ambos os grupos foram obtidos no *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA), reproduzidos no biotério da Faculdade de Medicina da “*Universidad de Valparaíso*” e doados pelo “*Laboratorio de Neurología Translacional*” da mesma universidade.

Foram alojados dois animais por gaiola a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com umidade relativa do ar constante (55%), e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas, com uma fase de luz das 8:00 am. às 8:00 pm. Alimentos e água foram fornecidos *ad libitum*.

O experimento foi conduzido de acordo com as diretrizes e regulamentos para o cuidado e uso de animais para fins científicos, conforme estabelecido nas diretrizes *ARRIVE* (ARRIVE, 2022) para a

substituição, refinamento e redução de animais em pesquisa (KILKENNY, et al., 2010); e seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Farmácia da “*Universidad de Valparaíso*” (Ata CBIA 02/2021) - Anexo 1.

Os camundongos foram separados em quatro grupos: um grupo transgênico com DA (grupo ALZ), um grupo transgênico com DA submetido a terapia (grupo ALZ+FBMTC), um grupo *Wild Type* (grupo WT), e um grupo *Wild Type* submetido a terapia (grupo WT+FBMTC). A classificação pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos animais de acordo com o seu estado e tratamento.

Tratamento \ Grupo	GRUPO WT	GRUPO ALZ
Grupo não submetido a FBMTC	n = 10	n = 10
Grupo submetido a FBMTC	n = 10	n = 10
TOTAL	n = 20	n = 20

À medida que o protocolo experimental foi desenvolvido, houve mortes de animais devido a fatores de idade e DA (8 mortes), por sua vez, amostras foram perdidas no momento da realização dos experimentos de eletrofisiologia (9 cérebros), de modo que o número total teve uma diminuição para um total de 23 camundongos, estabelecendo o grupo experimental como n=14 e grupo controle como n=9, distribuídos conforme evidenciado na tabela número 3.

Tabela 3: Classificação dos animais de acordo com o seu estado e tratamento depois de contabilizar mortes e perdas cerebrais.

Grupo	GRUPO WT	GRUPO ALZ
Grupo não submetido a FBMTc	n = 5	n = 4
Grupo submetido a FBMTc	n = 7	n = 7
TOTAL	n = 12	n = 11

5.3 Dispositivo para FBMTc

No presente trabalho para que a FBMTc pudesse ser convenientemente aplicada foi desenvolvido um dispositivo óptico operando na região do vermelho-630 nm, de forma a fornecer densidade de energia suficiente e com geometria adequada para irradiar a caixa craniana dos camundongos. A figura 2 abaixo apresenta o espectro de emissão do dispositivo LED utilizado no experimento.

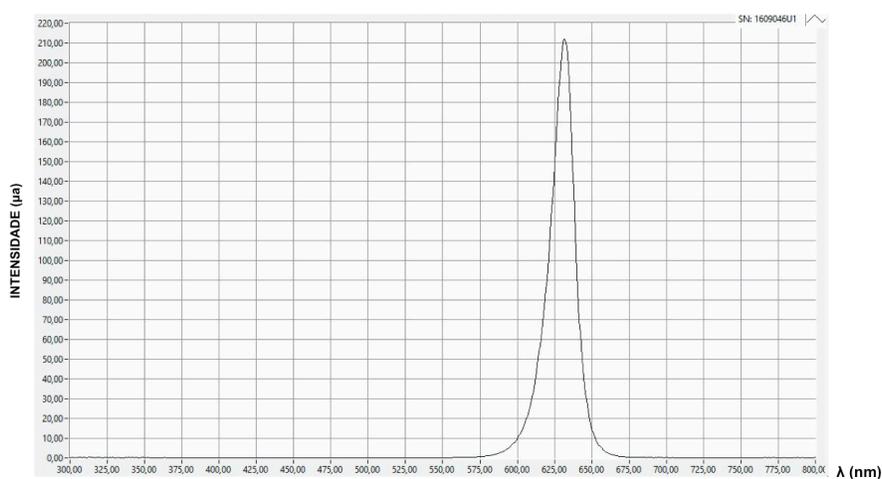


Figura 2: Espectro de emissão do dispositivo óptico utilizado – pico centrado em 630 nm.

Para a construção do dispositivo óptico de irradiação optou-se pelo módulo de LED's modelo 5050SMD, apresentado na figura 3, cujas características são apresentadas na tabela 4.

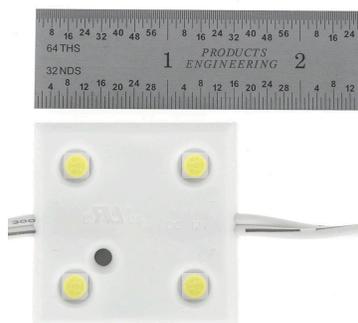


Figura 3: Módulo LED's. Fonte: Superbrightleds, 2022

Tabela 4: Características técnicas do módulo LED utilizado na implementação do dispositivo óptico.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS	VALOR ASSOCIADO
Abertura numérica	120°
Controle de potência	PWM
Qualificação ambiental	(Resistente à intempérie) IP65
Tempo de vida	50000 horas
Modelo	5050 SMD
Comprimento do módulo	38,5 mm
Tensão	11-14 VCC
Consumo de potência	0,8 W
Normas e certificações	Aprovado por ISA, compatível com RoHS, e reconhecido por UL

O módulo foi instalado em um circuito impresso e conectado a uma unidade de controle programada para fornecer corrente contínua durante 125 s, com potência óptica de 10,9 mW, e área de irradiação de 2,3 cm², dados a partir dos

quais os parâmetros de tratamento especificados na tabela 5 foram estabelecidos. A montagem do dispositivo pode ser vista na figura 4.

Tabela 5: Parâmetros de tratamento da FBMTC

PARÂMETRO	VARIAVEIS	CÁLCULO	VALOR DO PARÂMETRO
Energia	Potência óptica do LED (W) x tempo de irradiação (s)	10,9 mW x 125 s	1,36 J
Densidade de potência	Potência óptica do LED (W) / Área de Irradiação (cm ²)	10,9 mW / 2,3 cm ²	4,74 mW / cm²
Densidade de energia	Energia (J) / Área de Irradiação (cm ²)	1,36 J / 2,3 cm ²	0,59 J / cm²

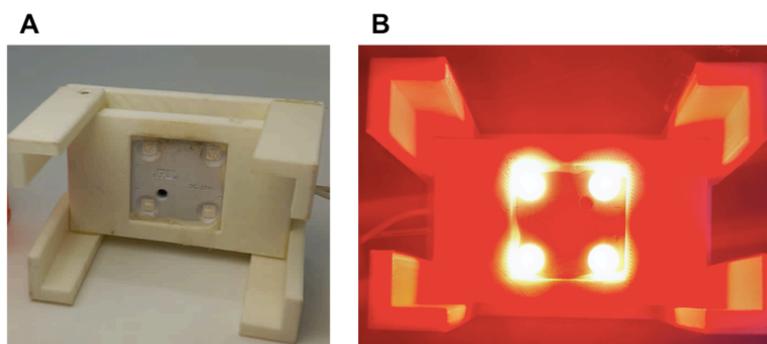


Figura 4: Dispositivo óptico desenvolvido para irradiação transcraniana (A) Dispositivo de irradiação desligado, (B) Dispositivo de irradiação ligado.

Para verificar os dados de potência e a distribuição espacial da radiação óptica entregue pelo dispositivo, foram realizados testes ópticos no laboratório de fotometria e controle de qualidade da "Pontificia Universidad Católica de Valparaíso" - Chile. A medição das variáveis foi realizada com um espectro radiômetro modelo ILT950 ("National Light Technologies" e a análise dos dados com o software *SpectrLight III v. 3.5*, com a adição de um sensor CMOS W#13326 que com área total de 2,5 cm². A face do sensor do espectro radiômetro foi posicionado a 1,6 cm da extremidade distal da fonte de luz LED por um período

de 125 s., realizando um total de 296 varreduras das quais foi feita a média para obtenção dos valores totais. A figura 5 apresenta a configuração do arranjo de medição.

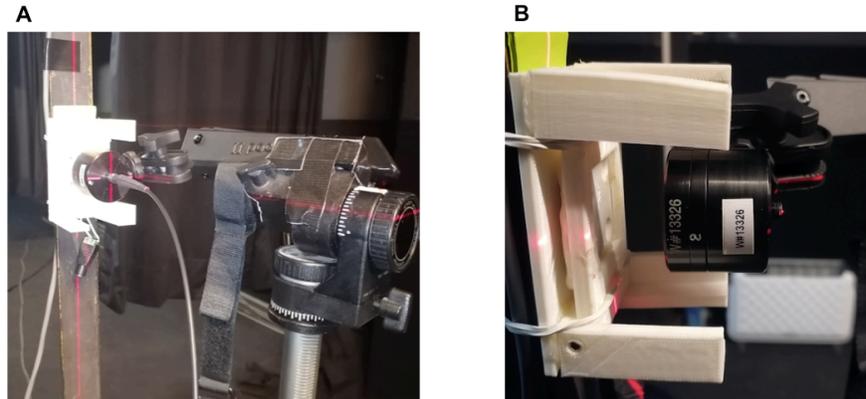


Figura 5: Configuração do arranjo de medição óptica. (A) Conjunto de medição da distribuição espacial da radiação óptica, (B) Detalhe do arranjo de medição.

A análise da distribuição da radiação óptica foi realizada a partir da digitalização de imagens usando o software livre "*imagej*" versão 1.53, no qual foi carregada a imagem total do campo de irradiação do módulo LED, e medida a distribuição de intensidade lumínica usando o arranjo "*plot profile*". Na figura 6 pode-se observar que o módulo de LED apresenta uma distribuição de irradiação homogênea na área de interesse.

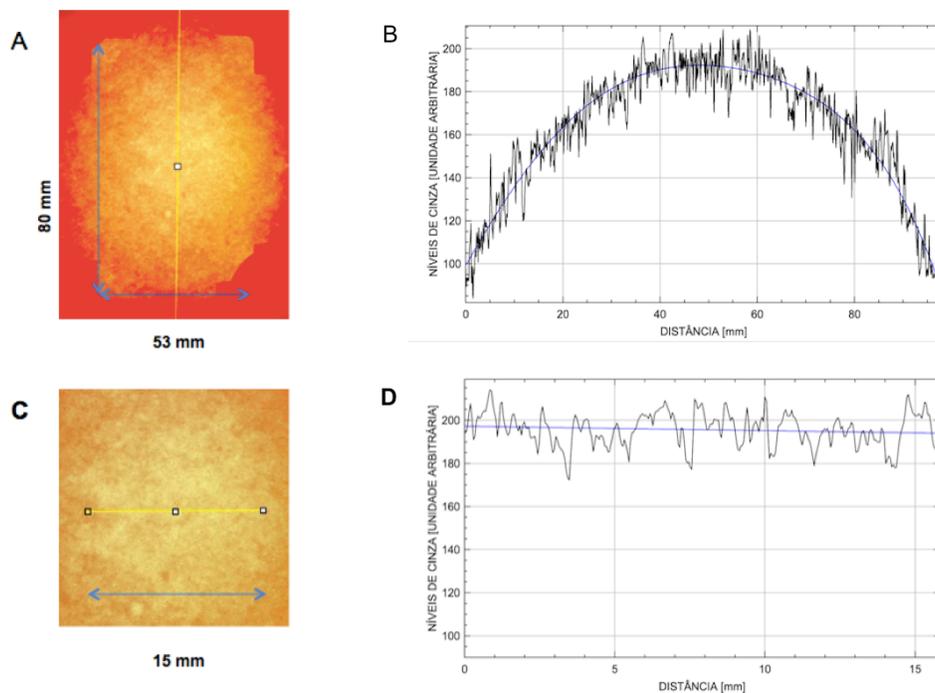


Figura 6: Distribuição da intensidade de irradiação óptica. (A) Foto da distribuição da radiação óptica, (B) Curva de distribuição da intensidade da radiação óptica do LED, (C) Foto da distribuição da radiação óptica (D) Curva de distribuição da intensidade da radiação óptica do LED ao longo do eixo X do crânio do camundongo, no comprimento.

5.4 Intervenções

Protocolo de pesquisa

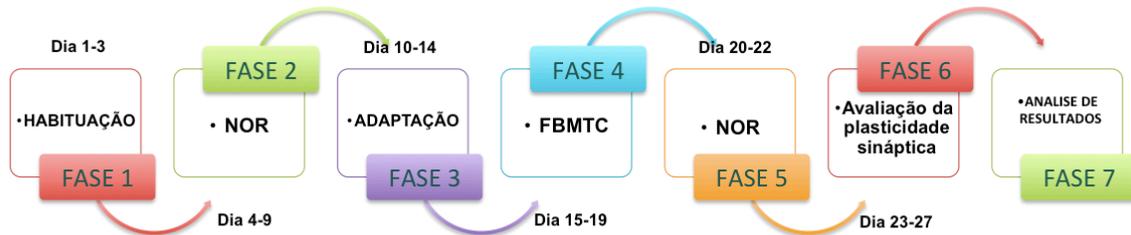


Figura 7: Protocolo de pesquisa.

Fase de habituação

Os animais de laboratório formam laços emocionais e reconhecem as pessoas que normalmente os manipulam, assim como reagem a situações e estímulos desconhecidos e com os quais não estão familiarizados (MOURELLE, et al., 2013). Por este motivo, sessões de habituação ao manejo dos animais foram realizadas antes do procedimento experimental. Isto permitiu à pesquisadora familiarizar-se com os camundongos e que os mesmos também se habituassem à pesquisadora. Paralelamente esse procedimento permitiu que os animais se adaptassem aos processos experimentais a que seriam submetidos, minimizando assim o estresse e o desconforto. Foram realizadas 2 fases de habituação, a primeira consistiu em manipular o animal sem qualquer tipo de intervenção, apenas para que o animal pudesse se adaptar à pessoa que realizaria a experiência. Essa fase teve duração de 3 dias na qual a pesquisadora mantinha contato com os animais sempre à mesma hora do dia. A segunda fase de habituação teve início no quarto dia e consistiu na aplicação de um "teste de campo aberto" (*open field*) na qual o camundongo (um animal de cada vez) explorava livremente a área experimental na qual foi realizado o teste de comportamento, isto durante 5 minutos por dia durante 3 dias consecutivos.

Avaliação da memória de reconhecimento por meio de NOR

Para avaliar a memória de reconhecimento, foi utilizada a tarefa de reconhecimento de objetos novos (NOR), que envolve a lembrança (memória) de um objeto familiar em paralelo com a detecção e codificação de um objeto novo. (ENNACEUR, 2010). Deve ser enfatizado que o protocolo de comportamento utilizado se baseia na motivação intrínseca dos animais para explorar objetos espontaneamente e não requer treinamento prévio ou a aplicação de reforços positivos ou negativos. (DIX, et al., 1999, WIMMER, et al., 2012). Desta forma, os camundongos serão mais frequentemente atraídos pelo objeto novo e passarão mais tempo explorando-o em comparação com o objeto já familiarizado. Esta aparente preferência pelo novo objeto é tomada como uma indicação de que há uma representação do objeto familiar na memória, ou seja, eles se lembram dele. (DERE, et al., 2007). Este é o princípio que fundamenta o teste de reconhecimento de novos objetos, que é um estudo amplamente utilizado para a análise das funções de memória em roedores e que tem sido capaz de se expandir para cobrir vários aspectos e tipos de memória (DIX, et al. 1999, JABLONSKI, et al., 2013, ARIAS, et al., 2015).

- **Área experimental:** como área experimental utilizou-se uma caixa de polietileno retangular de cor branca com dimensões 41 cm (X), 31 cm (Y) e 41 cm (Z), iluminada com luz branca com potência óptica de 3 W, com a função de facilitar a visualização e a filmagem dos animais. Uma câmera de vídeo foi conectada ao computador para o registro da atividade do animal. A caixa experimental foi instalada na sala de estudo de comportamento do biotério da Faculdade de Medicina da “*Universidad de Valparaíso*”.
- **Aplicação da tarefa de memória de reconhecimento mediante NOR:** a tarefa de reconhecimento consistiu em 4 períodos:

- O primeiro período consistiu na conclusão das fases de habituação 1 e 2 (já explicadas em parágrafos anteriores) que ocorreram a partir da data inicial do experimento, finalizando no sexto dia.
- Durante o período de amostragem, o animal é colocado na área experimental e apresentados a dois objetos idênticos, dando-lhes o tempo necessário para explorá-los livremente. A exploração, consiste na conclusão da fase de experimentação comportamental que ocorreu entre o 7º e o 8º dia do experimento, sendo definido como o período necessário para que o animal fareje ou toque o objeto com suas patas dianteiras a uma distância menor ou igual a 1 cm.
- No período de seleção, 9º dia, o animal retorna à área experimental, mas desta vez um dos objetos "familiares" é substituído por um novo objeto, semelhante em color, textura e dimensões aos anteriores, mas com forma diferente, sendo-lhe dado 5 minutos para explorar os dois objetos.

O protocolo de experimentação é apresentado na figura 8, a seguir.

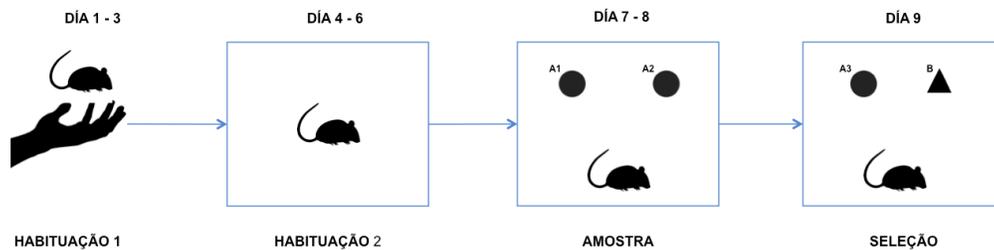


Figura 8: Esquema da avaliação da memória de reconhecimento de objetos (NOR).

Para a análise geral do teste de reconhecimento de objetos novos (*Novel Object Recognition Task* - NOR), foi utilizado o programa "ANY MAZE" versão 4.99 (*Software de rastreamento de comportamento-Stoelting Co.620, Wheat Lane,*

Wood Dale, IL 60191 EE.UU). Este teste mede o tempo de exploração em segundos. Os tempos de exploração foram usados para estimar o valor percentual de preferência de objeto e o nível de ansiedade tanto no grupo de controle quanto no grupo experimental, a qual foi calculada a partir da equação 1:

Equação 1: Porcentagem de preferência por um objeto

$$Preferência = \left(\frac{T_{on}}{T_{on} + T_{of}} \right) \times 100 [\%] \quad (1)$$

Onde *T_{on}* corresponde ao tempo de exploração do novo objeto e *T_{of}* corresponde ao tempo de exploração do objeto familiar. Além disso, os objetos A1 e A2 são os objetos usados para a fase de amostra; na fase de seleção foi usado: o objeto A3 que é o objeto familiar (idêntico aos objetos A1 e A2), e finalmente o objeto B que é um objeto do mesmo color, tamanho e textura, mas com uma forma diferente (figura 8).

Fase de adaptação ao dispositivo de FBMTTC

Para permitir o acondicionamento dos animais durante a irradiação foi concebida uma caixa de acrílico vermelha (caixa de irradiação - Figura 9) capaz de reduzir o fator de tensão garantindo a aplicação da FBMTTC com baixo estresse para o animal. Considerando o tamanho do animal e privar o seu deslocamento no interior da caixa, esta foi projetada com as seguintes dimensões: 8 cm x 4,8 cm x 4,8 cm, com uma abertura na parte superior de 2,3 cm² para a fixação do dispositivo óptico de irradiação. Na sua vez foi desenvolvido um método de adaptação dos animais ao dispositivo de FBMTTC, que consistiu em:

- Deixar uma caixa de acrílico vermelho em cada gaiola por um mês, para que os animais se acostumem a entrar nela livremente.
- Após o mês, foi realizada a fase de adaptação ao aparelho FBMTTC, que teve início no 10º dia do experimento, após a primeira fase de

experimentação comportamental aplicando NOR. Os animais foram introduzidos na caixa de acrílico já fora da sua gaiola, e sementes foram deixadas na referida caixa para que os camundongos "fossem motivados a entrar nela sem muita pressão do pesquisador, e ficassem sem se movimentar" por um período de 125 s. Esse procedimento foi realizado por 5 dias consecutivos, imitando o tempo de tratamento que seria administrado nos dias seguintes.

Nesta fase de adaptação ao dispositivo de FBMTc, os animais de ambos os grupos foram manejados juntos.

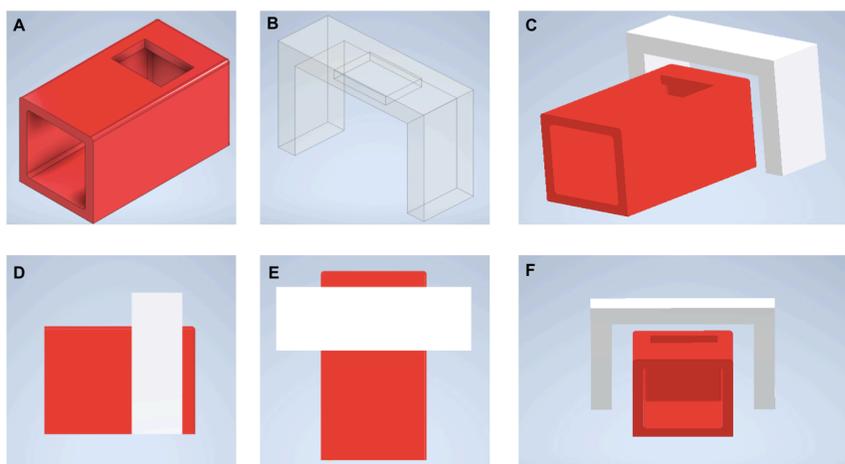


Figura 9: Caixa de irradiação.

Aplicação da Fotobiomodulação Transcraniana (FBMTc)

O protocolo de irradiação da FBMTc para os camundongos foi concebido com base na literatura científica, e nos dados das medições realizadas.

Para a determinação da dosimetria foi realizada uma correlação com tratamento proposto para humanos considerando que a expectativa de vida do ser humano é de 82 anos e que a expectativa de vida de camundongos é de dois anos, o tratamento típico de humanos que tem uma duração de seis meses, para

o camundongo equivaleria a 5 dias. Para a determinação da dosimetria nos baseamos em dados típicos da literatura que variam entre 0,5 e 10J/cm², no presente caso a densidade de energia aplicada foi de 0,59 J / cm².

Para determinar a área de irradiação sobre a cabeça dos camundongos foi realizada a medição da área da calota craniana de cada camundongo e em seguida calculando-se a média, que foi igual a 2,3 cm². Para o processo de irradiação, o camundongo foi inserido dentro da caixa de irradiação, o aparelho de LED posicionado sobre sua cabeça e ligado durante 125 s, conforme mostra a Figura 10.

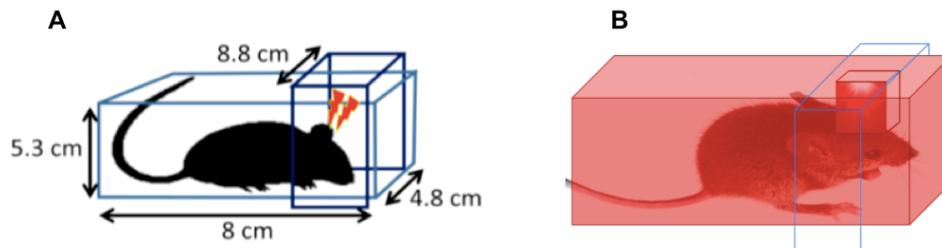


Figura 10: Aplicação da Fotobiomodulação Transcraniana nos camundongos, (A) Esquema de irradiação completo, (B) Simulação do camundongo sendo irradiado.

Avaliação da plasticidade sináptica

A plasticidade sináptica é um dos mecanismos que permitem as características adaptativas do sistema nervoso, e uma forma de avaliar esta plasticidade é através do estudo dos potenciais de campo, o que permite a pesquisa das propriedades funcionais das populações neuronais e sua relação com os processos neurais ou estados mentais (BERGADO, et al., 2011). A aplicação da eletrofisiologia para a realização de estudos de campo é um método amplamente utilizado devido a possibilidade de fazer interpretações em nível

celular, especialmente no que se refere à modificações na eficiência sináptica (ALMAGUER, et al., 2016).

A avaliação da plasticidade sináptica foi realizada um dia após a conclusão da segunda avaliação da NOR: a partir do 23° dia até o 27° dia do protocolo experimental.

- **Eutanásia e colheita de cérebros:** o animal foi colocado em um recipiente plástico com tampa hermética e anestesiado com solução de halotano. (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano, com 99% pureza de Sigma-Aldrich). Uma vez que o animal foi sedado, para verificar o nível de anestesia, foram medidos os reflexos dos membros posteriores. Em seguida, o animal foi eutanasiado por decapitação, o corte foi feito na região cervical com o uso de uma guilhotina para camundongos. O corpo do animal foi embalado, etiquetado e descartado como material biológico através do biotério da *Universidad de Valparaiso*, de acordo com os protocolos correspondentes. Enquanto isso, do crânio foram rapidamente extraídos os cérebros utilizando material cirúrgico estéril.
- **Obtenção de secções do hipocampo:** imediatamente depois de obtido o cérebro, ele foi transferido para uma placa de Petri com papel absorvente embebido em tampão de dissecação a frio (em mM: 212,7 sacarose, 10 glicose, 5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 26 NaHCO₃, pH 7,4, oxigênio (95% O₂ / 5% CO₂)). Com material cirúrgico estéril, o cerebelo e uma pequena secção do córtex frontal foram removidos, e o cérebro foi seccionado ao longo da fissura longitudinal. Uma vez obtida a região hipocampal, estes foram imediatamente montados verticalmente na platina de um *vibratome VT 1200 S (Leica, Wetzlar, Alemanha)*. Posteriormente, a platina foi imersa em tampão de dissecação gelado e oxigenado (95% O₂ / 5% CO₂) e os hipocampus foram cortados em secções transversais de 400 µm de largura e as secções foram transferidas para uma câmara

de imersão com uma solução de ACSF (em mM: 124 NaCl, 10 glicose, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, pH 7.4) e constante oxigenação (95% O₂ / 5% CO₂), permitindo que as secções se estabilizem à temperatura ambiente durante 2 h.

- **Registro eletrofisiológico:** as secções previamente estabilizadas em tampão ACSF foram transferidas para as câmaras de imersão da unidade *SET UP*, que tinha um fluxo constante de tampão ACSF (2 ml/min) a uma temperatura controlada de 30 ± 2 °C e oxigenação constante (95% O₂ / 5% CO₂). O *SET UP* é implementado com duas câmaras de imersão, portanto, foi possível gravar quatro secções simultaneamente. Os potenciais excitatórios de campo (fEPSP) foram evocados pela estimulação das fibras colaterais de Schaeffer com pulsos quadrados de corrente de 0,2 ms, aplicados com eletrodos de estimulação bipolares concêntricos (*Warner instruments*) e registrados extracelularmente com microeletrodos de vidro preenchidos com ACSF (2-3 MΩ) na região do *stratum radiatum* da área CA1 do hipocampo (ver Figura 11).

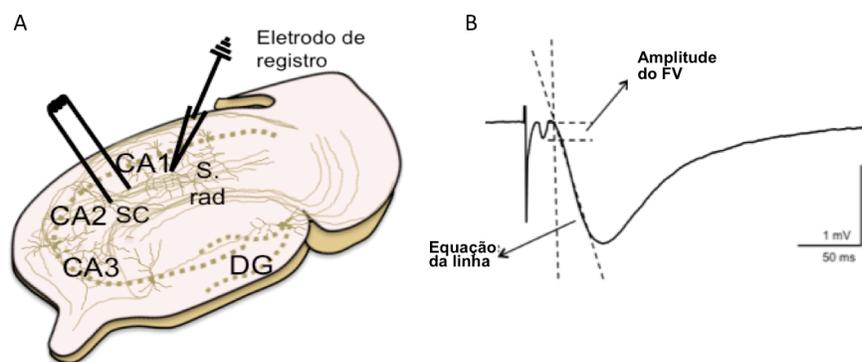


Figura 11: Corte histológico transversal do hipocampo e formas características de um potencial excitatório extracelular pós-sináptico (fEPSP): (A) Corte transversal do hipocampo utilizado em experimentos eletrofisiológicos. CA = chifre Ammonis. DG = giro dentado. SC = colaterais de Schaffer. S. radiatum = stratum radiatum. (B) Estimulação elétrica do SC causa um artefato de estímulo, seguido quase imediatamente por um aumento na resposta pré-sináptica, ou a *fiber volley* (FV). A amplitude do FV é diretamente proporcional ao número de fibras SC ativadas pelo estímulo. A pendência do fEPSP corresponde diretamente à resposta obtida nos neurônios piramidais CA1 (pós-sinápticos) em resposta à liberação de glutamato dos terminais SC. Fonte: MATHIS DM., et al., 2011.

O sinal é registrado, amplificado e visualizado no computador fornecido com o *software Igor Pro*. Gradualmente foram aplicados pulsos de 10, 25, 50, 75 e 100% da escala de estimulação a 200 microamperes para gerar curvas de resposta de *Input/Output* (I/O) usando um estimulador de corrente constante. Neste protocolo, a entrada (*input*) é representada pela amplitude máxima do *fiber volley* (FV), e a saída pela inclinação da linha do fEPSP, na análise destes dois parâmetros são traçados em relação aos diferentes intervalos de estimulação. Desta forma, foi avaliada a força de transmissão da sinapse.

A facilitação de pulso emparelhado (PPF) consiste em evocar dois estímulos consecutivos a cada 15 s com intervalos entre estímulos 20, 50, 100, 150, 200 e 250 ms. Para cada intervalo entre os estímulos, foram obtidas pelo menos três respostas e, em seguida, a média delas. Para a análise dos dados, é determinada a relação entre a segunda declive a primeira e a gráfica de intervalo entre estímulos.

Finalmente, os experimentos de plasticidade sináptica de longo prazo foram realizados após as determinações de I/O e PPF. Para isso, os pulsos eram entregues a cada 15 s evocando metade da resposta máxima, uma vez que a

resposta se estabiliza, uma resposta de base era registrada por um período mínimo de 20 min. Depois disso, um protocolo de baixa frequência (1Hz / 15min) era aplicado e fEPSPs eram registradas por 60 min para avaliar a indução da depressão de longo prazo LTD, como descrito por ARIAS et al., (2017). Enquanto isso, a potenciação de longo prazo (LTP) foi evocada pela estimulação de *theta burst* (TBS), que consiste em quatro trens de estimulação tetânica de alta frequência aplicados a 0,1 Hz. Cada trem consiste de dez tétanos (*burst* ou descargas) separados por 200 ms (5 Hz) e cada tétano é composto de quatro pulsos separados por 10 ms cada (100 Hz) (ARIAS, et al., 2017, MUÑOZ, et al., 2016). A resposta após a indução do LTP foi gravada por 60 minutos.

A resposta à plasticidade sináptica de longo prazo, LTD ou LTP, é observada de acordo com a redução ou aumento que experimentam aos declives dos fEPSP registrados após a indução dos respectivos protocolos, com referência aos declives da linha de base (pré-protocolo) como 100%. As secções hipocampais cujas respostas não estabilizaram dentro de um período máximo de 1 hora ou cuja resposta aumentou ou diminuiu desproporcionalmente foram descartadas do estudo e uma nova secção foi analisada.

5.5 Análise estatística

Avaliação da memória de reconhecimento (NOR)

Foi realizada uma análise Anova para a variável dependente: Porcentagem com variáveis independentes (efeitos fixos): objetos, etapas e tratamento e interações, para determinar a presença de diferenças significativas. Para isso, foi utilizado o programa *stata14* com um nível de confiança de 95%. Para esta análise, foram verificadas as suposições de homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos; posteriormente, foi realizado um teste de contraste dirigido para comparar as medianas entre os estágios pré e pós para determinar quais tratamentos e objetos apresentaram diferenças significativas. (*p-value* <0.05).

Avaliação da plasticidade sináptica

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad (San Diego, CA)*. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados paramétricos, foi aplicado o teste *T de Student* de duas caudas não emparelhadas para comparação entre os dois grupos. Para comparações múltiplas, o teste ANOVA foi aplicado com testes *pós-hoc* correspondentes. Para dados não distribuídos normalmente, foram aplicados testes não paramétricos. Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Quando as premissas não são satisfeitas e os dados não são paramétricos, é recomendável usar o teste Kruskal-Wallis.

6. RESULTADOS

6.1 Memória de reconhecimento usando NOR

Durante a segunda fase de habituação foi aplicado o "teste de campo aberto", no qual os camundongos exploram livremente a área experimental, a distância total percorrida, o tempo gasto nos cantos e no centro, assim como o número de entradas nos cantos e na zona central foram registrados (figura 12). Foram obtidos padrões de comportamento similares entre os grupos experimentais, indicando que os animais não apresentam uma componente de ansiedade antes, durante ou após a aplicação da FBMTc. De acordo com os resultados obtidos nos camundongos WT e ALZ antes e depois da aplicação da FBMTc, os padrões de comportamento são praticamente idênticos aos do grupo WT.

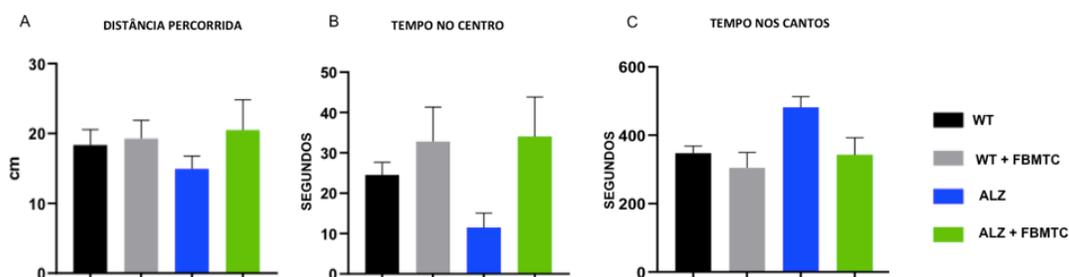


Figura 12: Resultado experimental do "teste de campo aberto" (segunda fase de habituação) (A) Distância total percorrida pelos camundongos na segunda fase de habituação (B) Tempo gasto na zona central (C) Tempo gasto nos cantos. Ao analisar estes gráficos, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa no nível de ansiedade dos grupos, indicando que os animais não apresentam um componente ansioso antes, durante ou após a aplicação do FBMTC, mas observa-se uma tendência nos camundongos com terapia em que eles apresentam mais confiança ao percorrer à área experimental.

Os resultados para cada grupo experimental são mostrados na figura 13, na qual se pode ver que:

- **Grupo WT:** na fase de amostra, os camundongos exploraram o objeto A1 em um 47,69 % e objeto A2 em um 52,30 %, enquanto na fase de escolha, a exploração do objeto A3 foi de um 42,59 % e a de B um 57,40 %. Ao analisar os dados pode-se concluir que na fase de amostra não há preferência por nenhum dos objetos, mas na fase de escolha há uma ligeira preferência pelo objeto novo.
- **Grupo ALZ:** a figura mostra o desempenho do grupo APP/PS1 que não foi submetido ao FBMTC (ALZ), à esquerda na fase de amostragem observa-se que exploram 50,64% do objeto A1 e um 49,36% do objeto A2, de modo que se exclui a preferência de indivíduos por qualquer um dos dois objetos. No entanto, na fase de escolha, observa-se que os camundongos preferem o objeto A3 (61,48%) em comparação com o objeto B (38,52%), o resultado indica que este grupo não realiza a tarefa.
- **Grupo WT+FBMTC:** ao contrastar a porcentagem de exploração dos objetos A1 (46,05%) e A2 (53,95%) na fase de amostra, e a

porcentagem de exploração dos objetos na fase de escolha A3 (46,82%) e B (53,18%), observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre o valor da porcentagem de exploração dos objetos, nas diferentes tarefas, o que significa que não há preferência por nenhum dos dois objetos.

- **Grupo ALZ+FBMTC:** neste grupo observa-se que na fase de amostra os indivíduos exploram o objeto A1 com 51,32% e o objeto A2 com 48,68%. Estes dados confirmam que os animais testados mostram a mesma preferência por ambos os objetos. E na fase de escolha, os camundongos testados têm uma taxa de exploração de 71,1% para o objeto novo B , que é muito superior à taxa de escolha para o objeto familiar 3 (28,8%), em outras palavras, eles foram bem sucedidos na execução da tarefa, o que confirma que a FBMTC tem um efeito estimulante na memória de reconhecimento em animais com DA.

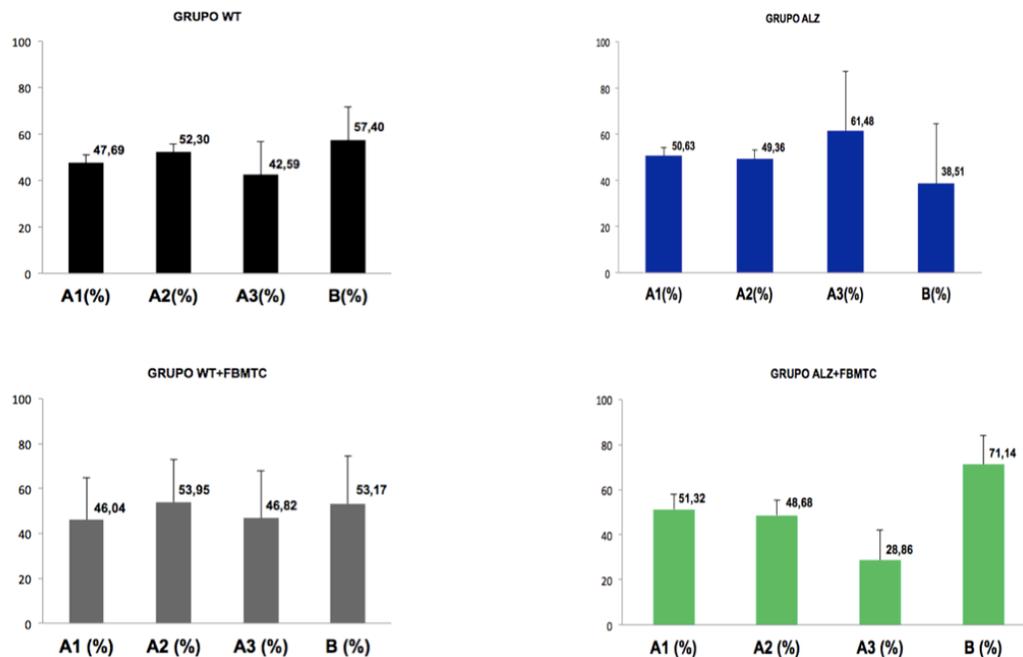


Figura 13: Porcentagem de preferência por um objeto, para cada um dos grupos experimentais (A) Porcentagem de preferência por objeto para o grupo WT, onde na fase de amostra não há preferência por nenhum dos objetos, mas na fase de seleção há uma ligeira preferência pelo objeto novo (B) Porcentagem de preferência por objeto para o grupo ALZ, onde o resultado indica que este grupo não realiza a tarefa. (C) Porcentagem de preferência de objeto para o grupo WT+FBMTC, onde não é observada preferência por nenhum objeto (D) Porcentagem de preferência de objeto para o grupo ALZ + FBMTC, onde os camundongos preferem o objeto novo (B) ao objeto familiar, cumprindo assim a tarefa de reconhecimento do objeto novo.

Para contrastar os resultados observados independentemente nos grupos experimentais, foi elaborado um gráfico (figura 14) evidenciando a porcentagem de preferência do objeto B, ou seja, o objeto novo; onde o grupo WT explorou o objeto B em 57,40%, o grupo WT+FBMTC em 53,17%, o grupo ALZ em 38,51% e o grupo ALZ+FBMTC em 71,14% em um tempo médio de 18,05 s. Como esperado, o grupo WT passou mais tempo explorando o objeto novo em comparação com o grupo ALZ; além disso, o grupo ALZ passou mais tempo explorando o objeto familiar, sugerindo dano na memória de reconhecimento. Quanto aos grupos tratados com FBMTC, observou-se que o grupo WT+FBMTC apresentou um comportamento semelhante ao grupo WT; entretanto, o grupo ALZ+FBMTC aumentou sua preferência pelo objeto novo, embora este resultado não tenha sido estatisticamente significativo (o que é assumido pelo baixo número

de animais de experimentação). Em um nível geral, pode-se dizer que FBMTc apresenta uma tendência de melhora da memória de reconhecimento de objetos novos em camundongos do grupo ALZ+FBMTc, porém com $p > 0,05$.

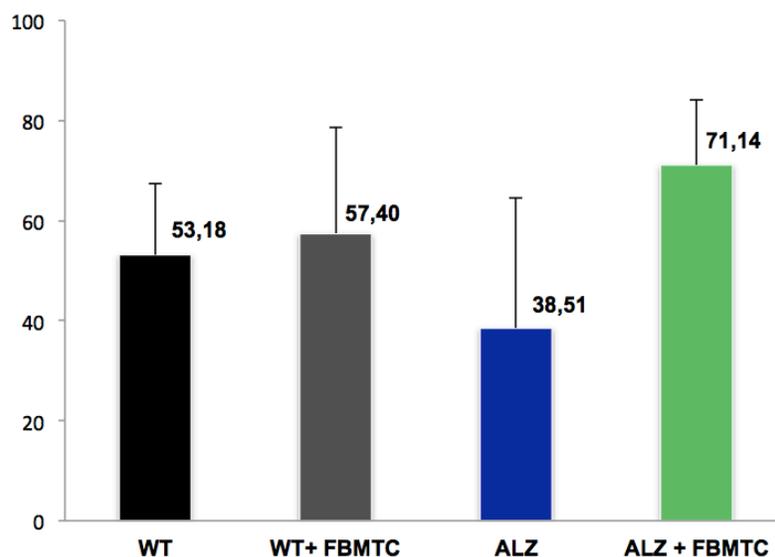


Figura 14: Porcentagem de preferência do objeto B (Objeto novo).

6.2 Experimentos de plasticidade sináptica utilizando estudos de campo

Foi explorada a possibilidade de que a aplicação do FBMTc influencie a sinalização e a excitabilidade dos neurônios nas sinapses colaterais Schaffer-CA1 (Figura 10). Para conseguir isto, as curvas de I/O foram geradas a partir de registros extracelulares detectados 60 minutos após o período de estabilização das fatias no buffer ACSF. Para cada uma das intensidades (μA) em que os estímulos elétricos foram aplicados, o fEPSP obtido para cada um dos grupos foi semelhante às respostas do grupo WT, sugerindo que o FBMTc não gerou nenhuma mudança apreciável na sinalização basal dos grupos ALZ+FBMTc e WT+FBMTc. A análise estatística das amplitudes do FV versus intensidade do estímulo mostra que o tratamento FBMTc não afetou as respostas FV para qualquer um dos grupos que receberam o tratamento quando comparado ao grupo

WT, mas há uma diferença significativa entre as respostas pré-sinápticas obtidas para o grupo ALZ quando comparado ao grupo WT (Figura 15B). O grupo ALZ mostrou maior sensibilidade ao estímulo.

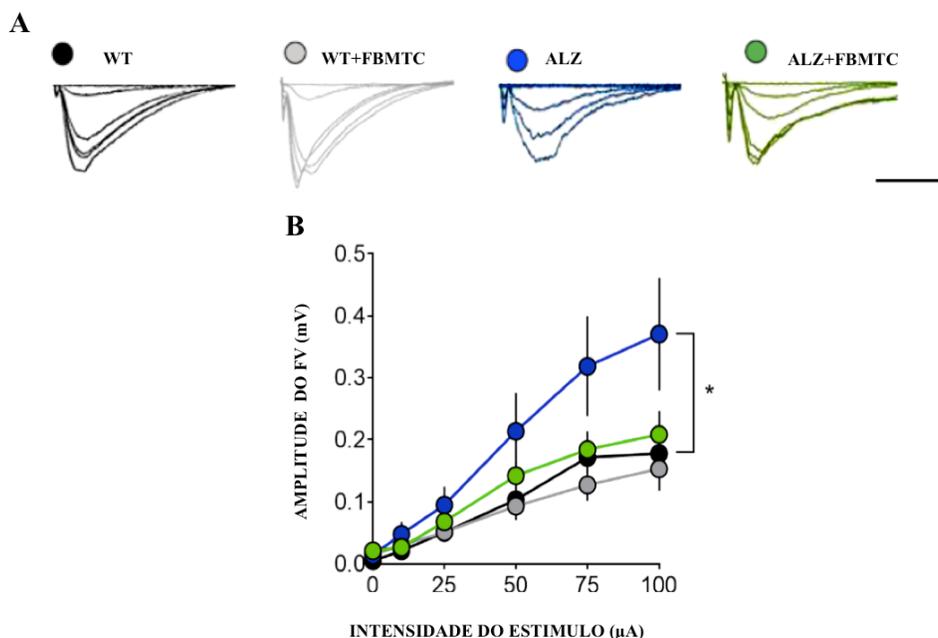


Figura 15: Efeitos da FBMTc na transmissão sináptica basal em sinapses hipocâmpicas colaterais de Schaffer-CA1. (A) Traços representativos para cada grupo experimental de potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (fEPSP) registrados em diferentes intensidades de estímulo para tipo selvagem (WT), ALZ, WT + FBMTc, e ALZ + FBMTc. Barra de calibração (amplitude em 0,3 mV versus tempo em ms) (B) Curva de entrada/saída (I/O) mostrando a relação entre a inclinação da reta do fEPSP e a amplitude da *fiber volley* versus a intensidade do estímulo. Um aumento na inclinação da reta do fEPSP foi observado em camundongos ALZ + FBMTc em comparação com os camundongos WT+FBMTc, assim como um aumento na amplitude da *fiber volley* nos camundongos ALZ em comparação com os camundongos WT.

Para analisar se a aplicação do FBMTc melhora a atividade pré-sináptica, foram avaliadas as respostas de facilitação de pulso emparelhado (PPF) nas quatro condições do estudo. De acordo com a análise estatística, a aplicação da FBMTc não modificou de forma alguma as relações de pulso emparelhado em nenhum dos intervalos de tempo em que o estímulo foi dado (Figura 16). Da mesma forma, não foi observada nenhuma diferença significativa entre o

comportamento das respostas para o grupo ALZ sem terapia em comparação com o grupo WT.

Estes resultados, combinados com os obtidos para I/O, sugerem que a aplicação de FBMTTC não modifica os sinais elétricos registrados durante a transmissão sináptica basal, e não afeta as propriedades fEPSP na faixa de estimulação <math><100 \mu\text{A}</math>, uma faixa que foi usada em todos os experimentos subsequentes.

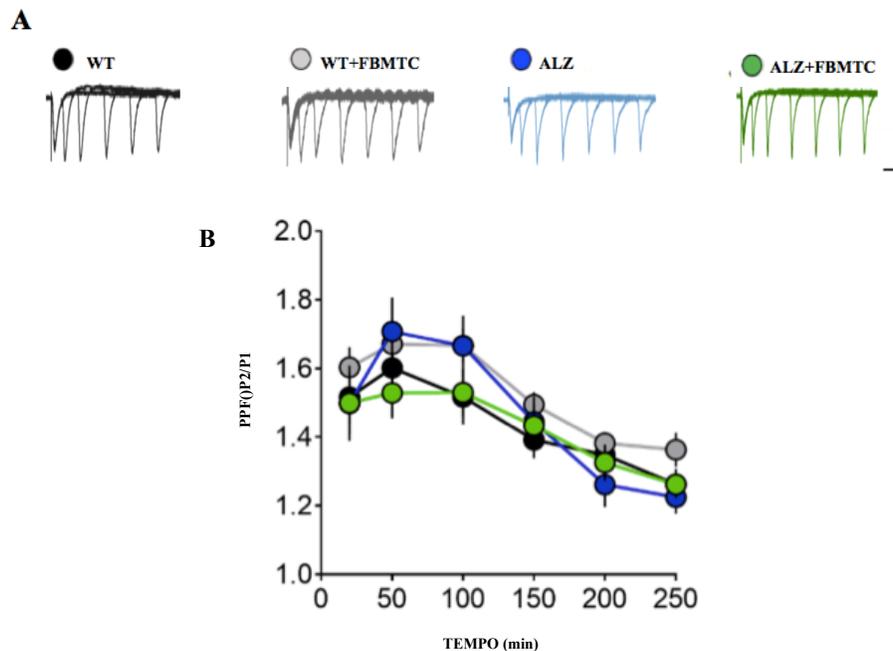


Figura 16; Efeitos do FBMTTC sobre a facilitação de pulso emparelhado (PPF) medidas em sinapses hipocâmpais CA3-CA1. (A) Traços representativos do fEPSP mostrando respostas PPF em diferentes intervalos de tempo (20-250 ms) para tipos selvagens (WT), transgênicos (ALZ), WT com tratamento (WT+ FBMTTC), e ALZ com terapia (ALZ+ FBMTTC). Barra de calibração (amplitude em 0,3 mV versus tempo em ms). (B) O gráfico ilustra a relação de facilitação versus intervalos de interstícios. Os valores representam média \pm SEM. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de estudo.

Após avaliarmos a transmissão sináptica de base, foi avaliada se a aplicação do FBMTTC modifica a capacidade da sinapse de desenvolver plasticidade sináptica de longo prazo (Figura 17). Para testar isto, nas quatro condições experimentais foi aplicado um protocolo *theta burst* (4xTBS) de 15 minutos após uma linha de base estável ter sido mantida para induzir a

potenciação sináptica (LTP) a longo prazo, e o registro da resposta foi mantido por até 40 minutos após o protocolo para avaliar a manutenção da LTP.

Como resultado, foi observado que o grupo WT (figura 12B) mostrou um LTP robusto e estável após a aplicação do protocolo 4xTBS. Com referência às inclinações da reta da linha de base (pré-LTP) como 100%, o grupo WT manteve uma média de $150 \pm 5,3 \%$ ($**p < 0,0018$), sendo que esta mudança aumentou para o grupo WT que recebeu terapia (WT+FBMTC) com uma média de $160,4 \pm 5,3 \%$ ($****p < 0,0001$), conforme a figura 12C. Em contraste, observa-se que no grupo ALZ as inclinações da reta pós-indução do LTP apresentam uma ligeira mas significativa potenciação de $130,7 \pm 5,9\%$ ($*p < 0,05$) em relação à linha de base. Além disso, pode-se observar na figura 12C como a aplicação do FBMTC afeta o LTP do grupo ALZ que recebeu a terapia (ALZ+FBMTC) melhorando sua indução e estabilidade após a aplicação do protocolo determinando um LTP médio igual a $165,2 \pm 4,2 \%$ ($****p < 0,0001$) com referência à respectiva linha de base.

Finalmente, como pode ser visto na figura 12C do painel inferior, uma comparação entre as magnitudes do LTP para cada grupo utilizando o teste *Kruskal-Wallis* apresenta uma diferença robusta entre o nível de potenciação do grupo ALZ versus o grupo WT, demonstrando uma menor intensidade para o grupo ALZ. Entretanto, esta diferença com o grupo WT se perde quando comparado ao grupo ALZ que recebeu FBMTC, sugerindo que a FBMTC melhora a condição dos camundongos com DA em termos de expressão do LTP. Isto, por sua vez, é demonstrado pela diferença robusta gerada entre os grupos ALZ com e sem terapia.

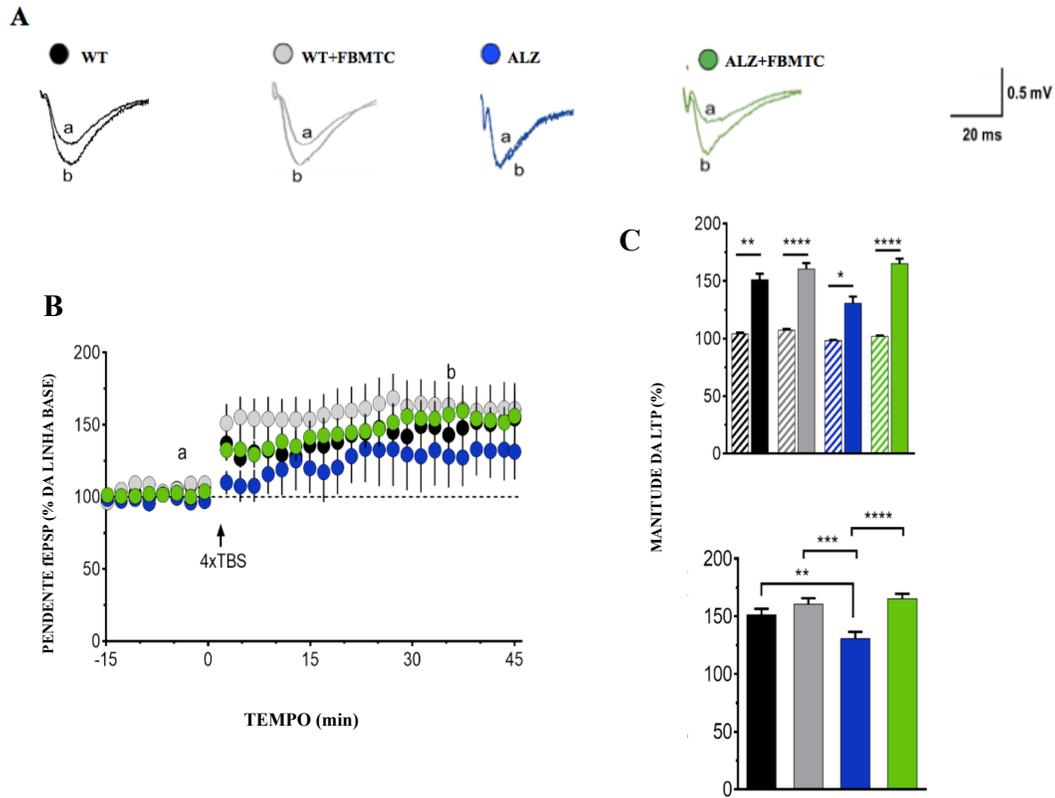


Figura 17: Aumento da potencialização de longo prazo (LTP) na via colateral Schaffer-CA1 de camundongos ALZ submetidos ao FBMTC. (A) Traços representativos de cada grupo experimental de potenciais excitatórios de campo (fEPSP) registrados 10 minutos antes (a) e 30 minutos depois (b) da aplicação do protocolo de estimulação *theta burst* (4xTBS). A direita: barra de calibração. (B) Potencialização de longo prazo (LTP) induzida por um protocolo 4xTBS na sinapse de Schaffer colateral-CA1. O protocolo 4xTBS foi entregue no momento indicado pela seta. A linha horizontal tracejada indica a linha de base (antes do protocolo) como 100% da resposta. (C) Acima: comparação entre a magnitude média do LTP medida em (a) (barras com padrão tracejado) e em (b) para camundongos do tipo selvagem (WT) e transgênicos (ALZ) sem e com tratamento (WT+FBMTC, ALZ+FBMTC). Teste *U Mann-Whitney* (* $p < 0,05$). Abaixo: comparação entre grupos de magnitudes médias LTP medidas apenas em (b). Teste *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste pós-hoc de Dunns para comparação entre grupos. Significância estatística (* $p < 0,05$). Os valores representam média \pm SEM.

Após a análise da potencialização de longo prazo, foram avaliadas as respostas sinápticas de cada grupo no protocolo de baixa frequência visando induzir a depressão de longo prazo. Inicialmente foi determinado o nível de indução de LTD para cada grupo, e apesar de todos os grupos terem demonstrado uma indução de LTD robusta, nem todos foram capazes de sustentá-la ao longo do tempo. Assim, o grupo WT sem e com FBMTC induziu e manteve um LTD forte

durante 40 minutos após-protocolo com médias de $90 \pm 1,3\%$ e $85,22 \pm 1,9\%$ respectivamente, com referência à média da linha de base (pré-LTD) como 100%, conforme mostram as figuras 18B e 18C.

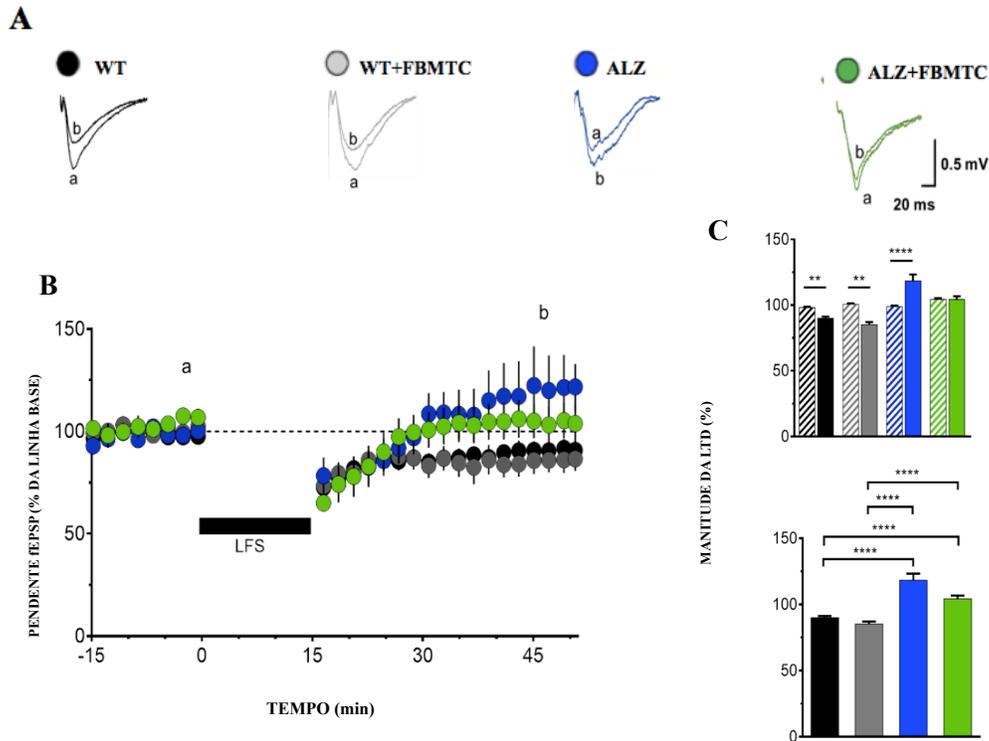


Figura 18: O grupo ALZ demonstra a expressão alterada da depressão sináptica de longo prazo (LTD). (A) Traços representativos de cada grupo experimental de potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo (fEPSP) registrados 10 min antes (a) e 30 min depois (b) do protocolo de estimulação de baixa frequência (LFS; 900 pulsos /15 min). A direita: barra de calibração. (B) Depressão de longo prazo (LTD) induzida por um protocolo LFS na sinapse Schaffer colateral - CA1. O protocolo LFS foi entregue durante o tempo indicado pela barra preta. A linha horizontal tracejada indica a linha de base antes do protocolo LFS como 100% da resposta. (C) Acima: comparação entre a magnitude LTD média medida em (a) (barras de padrão listradas) e (b) para do tipo selvagem (WT) e transgênicos (ALZ) sem (WT) e com tratamento (WT+FBMTC) e ALZ com tratamento (ALZ+FBMTC). Teste U Mann-Whitney (* $p < 0,05$). Abaixo: comparação entre grupos de magnitudes médias LTP medidas apenas em (b). Teste *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste pós-hoc de Dunns para comparação entre grupos. Significância estatística (* $p < 0,05$). Os valores representam média.

As figuras 18B e 18C mostram claramente como o grupo ALZ, em vez de expressar uma depressão sináptica em resposta ao protocolo de estimulação, mostra uma indução de LTD que não é capaz de ser sustentada ao longo do tempo e após minutos é transformada em uma potenciação robusta que é sustentada com uma média de $118,4 \pm 4,8 \%$ ($p < 0,0001$), com referência à média de base (pré-LTD) como 100%. Entretanto, este comportamento alterado do grupo ALZ é observado como limitado no grupo ALZ + FBMTC onde se observa que, embora a expressão LTD não seja sustentada no o tempo, o traço anômalo de potenciação é eliminado neste grupo e a resposta média à LTD é mantida em valores similares à linha de base $104,4 \pm 2,5 \%$ ($p > 0.05$), conforme a figura 13C painel superior.

Finalmente, uma comparação entre grupos (figura 13C, painel inferior) mostra diferenças significativas entre o grupo WT e o grupo ALZ com e sem FBMTC, bem como diferenças entre o grupo WT + FBMTC e os grupos ALZ com e sem FBMTC. É importante ressaltar que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WT com e sem irradiação. Nesta experiência, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ALZ com e sem FBMTC.

7. DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo cuja fisiopatologia exata permanece pouco clara. Entretanto, evidências crescentes sugerem disfunção sináptica a nível hipocampal mediada pela agregação anormal de proteínas A β e oligômeros TAU, levando a um declínio nas funções cognitivas do indivíduo (LI, et al. 2018). Tratamentos emergentes não invasivos, como FBMTc podem ser úteis para minimizar o dano cerebral e assim melhorar as funções cognitivas (COTELLI, et al., 2014).

Existem outras técnicas de estimulação cerebral não invasivas que demonstram importantes avanços na reabilitação cognitiva dos neurônios de pacientes com DA, incluindo a estimulação magnética transcraniana, estimulação transcraniana de corrente contínua, estimulação nervosa transcutânea e estimulação do nervo vago. (BORGOMANERI, et al., 2020). A estimulação magnética transcraniana profunda do córtex pré-frontal de pacientes com DA melhorou a atenção, as funções viso-espacial e executiva (DE FREITAS, et al., 2016), enquanto a estimulação magnética transcraniana repetitiva do córtex pré-frontal dorsolateral pode até mesmo regular os processos emocionais, interrompendo a reconsolidação da memória humana do medo (ZHANG, et al., 2020). Estas técnicas de estimulação cerebral magnética não invasiva também são promissoras para o tratamento da DA; entretanto, estas técnicas de estimulação podem produzir contra-indicações em pacientes com histórico de epilepsia ou naqueles que ingerem medicação estimulante. A este respeito, é necessário aplicar técnicas de estimulação cerebral mais seguras, como a FBMTc.

Quanto aos mecanismos do FBMTc, foi demonstrado que esta terapia pode levar a benefícios cognitivos, melhorando a memória e o aprendizado através da modulação da função mitocondrial, reduzindo a inflamação e auxiliando o cérebro a se reparar, estimulando o processo de neurogênese e aumentando a sinaptogênese no córtex, hipocampo e zona subventricular (CHO, et al., 2020). Até hoje, o mecanismo de ação mais bem descrito da FBMTc tem sido a reação

de citocromo C oxidase (CCO), o principal cromóforo mitocondrial ou molécula fotoaceptora. (SHEN, et al., 2021). O CCO desempenha um papel central na bioenergética das células eucarióticas ao promover a formação do trifosfato de adenosina (ATP) através da fosforilação oxidativa após o FBMTC. (THOMAS, et al., 2021). Além disso, a FBMTC pode aumentar as proteínas anti-apoptóticas (BCI2 e SURVIVIN), melhorando assim a neuroproteção e a neuro recuperação (ZHAO, et al., 2010). Uma vez que a DA foi ligada à disfunção mitocondrial, a FBMTC pode ser um tratamento viável para a DA (HAMBLIN M, 2016).

Um dos principais resultados deste trabalho é que a FBMTC aplicada no comprimento de onda de 630 nm, apresenta uma tendência de melhora das habilidades cognitivas em um modelo murino de DA. É provável que, aumentando o tempo de aplicação ou a densidade de energia, se possa obter efeitos significativos no comportamento, uma vez que os resultados são consistentes com estudos relatados anteriormente, na qual a FBMTC foi capaz de reverter o dano cognitivo e melhorar a memória (HENNESSY, et al., 2017). Em particular, a memória de reconhecimento é uma das mais afetadas durante a progressão da DA e os resultados obtidos usando FBMTC mostram uma tendência de melhora nos camundongos transgênicos onde os sintomas relacionados à DA são manifestados, sem afetar outros parâmetros comportamentais, tais como ansiedade e atividade locomotora.

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por Da Luz et al., (2017) que evidenciaram que o uso de FBMTC em camundongos com DA apresentou uma redução significativa nas placas de A β , juntamente com um efeito benéfico nas tarefas comportamentais e locomotoras. Além disso, Zhang et al. (2020) demonstraram que o FBMTC pode efetivamente penetrar no cérebro, revertendo assim os problemas de memória/aprendizado espacial e reduzindo os níveis de A β em camundongos modelo DA. Neste sentido, Cho et al., (2020) sugeriu que a melhoria das funções cognitivas poderia ser uma consequência da redução do acúmulo da A β , da perda neuronal e da gliose. Para explorar os possíveis mecanismos celulares por trás dessas melhorias e dado que a memória

induz mudanças no nível neuronal que se correlacionam com mudanças na eficácia sináptica (CHEN, et al., 2021), avaliaram variações ao nível sináptico em animais que foram tratados com FBMTC. Ao que nos consta, esta é a primeira vez que os efeitos da FBMTC sobre o PS foram descritos eletrofisiologicamente usando um modelo de camundongos transgênicos de DA.

É interessante notar que houve uma melhoria notável e significativa no LTP de animais DA tratados com FBMTC, revertendo os defeitos de nível sináptico observados neste grupo, atingindo níveis basais. Além disso, se descobriu que a FBMTC reverteu parcialmente o LTD anormal observada nos animais transgênicos que desenvolvem DA. Estes resultados são consistentes com Comerota et al., (2017) que avaliou o efeito do tratamento com infravermelho próximo na vulnerabilidade sináptica induzida pelo oligômero A β usando fatias hipocâmpais de camundongos WT, da mesma forma, eles identificaram que a terapia com luz infravermelha restaurou significativamente o LTP. Para explorar o efeito da FBMTC na plasticidade de longo prazo, Shen et al., (2021) mostrou que esta técnica suprime o JNK3 ao ativar a via ERK/MKP7 atenuando a endocitose do receptor AMPA na doença de Alzheimer, que tem papéis críticos no LTP e LTD. (THOMAS, et al., 2021, ZHAO, et al., 2010). Além disso, postula-se que os fótons emitidos na FBMTC são absorvidos pelo (CCO) mitocondrial facilitando a disponibilidade de elétrons e reduzindo o oxigênio molecular, aumentando o potencial da membrana mitocondrial, assim como os níveis de (ATP) e monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) (HENNESSY, et al., 2017). Também, o aumento do ATP e do cAMP leva à dissociação do óxido nítrico (NO), que por sua vez induz aumento do ATP, ativando funções celulares (HAMBLIN, 2016), e superando as disfunções mitocondriais observadas na DA (CHEN, et al., 2021).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a FBMTC pode ser uma alternativa eficiente para melhorar a plasticidade sináptica (SP) e uma possível ferramenta para reparar as propriedades cognitivas prejudicadas em pacientes com DA. Embora sejam necessários mais ensaios com maior número de amostras, o desenvolvimento de dispositivos que combinem a estimulação

luminosa com o registro neural levará a uma neuromodulação mais eficaz, especialmente no que diz respeito aos distúrbios cognitivos, afetivos e motores (LI, et al., 2020). Um aspecto importante desta terapia é que ela tem poucos efeitos adversos. De fato, nos trabalhos de Chao (2019) e Saltmarche et al. (2017), os efeitos da FBMTc in vivo foram avaliados em um grupo de pacientes com demência e não mostraram efeitos adversos. Estes resultados diferem de estudos anteriores que utilizaram tratamentos farmacológicos nos quais pacientes relataram sintomas adversos como vômitos, náuseas ou diarreia (DEARDORFF, et al., 2015, WILCOCK, et al., 2003).

Neste trabalho, a adaptação dos camundongos ao dispositivo foi um passo crítico que limitou a incorporação de indivíduos estressados em experimentos comportamentais. Neste sentido, considera-se que uma amostra maior, apresentaria melhor resultado estatístico e significância dos resultados comportamentais. Por outro lado, na maioria dos tratamentos que utilizam FBMTc, são gerados diferentes efeitos celulares, dependendo do comprimento de onda e da densidade de energia. Como outros estudos mostraram, a FBMTc operando na região de vermelho-630nm, produz um efeito positivo sobre o cérebro, e que para tempos de exposição mais longos diferenças estatísticas mais significativas seriam obtidas em trabalhos com foco em respostas comportamentais.

Entretanto, os resultados obtidos são promissores e motivam um estudo mais amplo explorando os mecanismos de ação da FBMTc e seus efeitos sobre as mudanças patológicas na DA. Em última análise, espera-se que estes resultados motivem o teste destas tecnologias revolucionárias em pacientes humanos com DA com habilidades cognitivas danificadas. Para isso, é necessário explorar os efeitos da FBMTc em diferentes estágios do contínuo da DA.

A inovação da presente pesquisa tem como base evidências científicas explicitando que a FBMTc exerce um efeito positivo sobre a PS e um possível benefício sobre as funções cognitivas em sujeitos com DA, utilizando um dispositivo especialmente projetado para este caso. Os desafios futuros estão relacionados com o comprimento de onda utilizado, dosimetria, duração e

frequência do tratamento, bem como a avaliação dos diferentes graus de comprometimento cognitivo dos sujeitos tratados.

8. CONCLUSÃO

A aplicação da FBMTC utilizando um dispositivo óptico com comprimento de onda de 630 nm, potência óptica de 10,9 mW, densidade de potência de 4,77 mW/cm², densidade de energia de 0,54 J/cm² desenvolvido especificamente para este trabalho, mostra uma tendência de estimulação positiva para aspectos relativos à memória de reconhecimento, e benéfica para a plasticidade sináptica de um modelo animal adaptado para a doença de Alzheimer, sendo que estes dados puderam ser analisados a partir da medição das capacidades cognitivas por meio do NOR, e através de medidas eletrofisiológicas no cérebro: estudos de registro de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNER E., NELSON P., KRYSZCIO R., SCHMITT F., FARDO D., WOLTJER R., CAIRNS N., YU L., DODGE H., XIONG C., et al. **“Diabetes is associated with cerebrovascular but not alzheimer’s disease neuropathology”**, J. Alzheimer’s Dis., Vol. 60, 2017.

AHMAD A., TABRIZI S., FISHER E., **“Mouse models as a tool for understanding neurodegenerative diseases”**, Curr. Opin. Neurol., Vol. 16 (4), 2003.

ALMAGUER M., MERCERÓN D., DELGADO S., PAVÓN N., LEDÓN N., BERGADO J., **“EPO induces changes in synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of rats”**. Synapse, Vol. 70, <https://doi.org/10.1002/syn.21895>, 2016.

ÁLVAREZ C., RODRÍGUEZ A., SALAS B., **“Influencia de la enfermedad de Alzheimer en los sistemas de neurotransmisión sináptica”**. Revista Médica Sinergia. Vol. 5(04). 2020.

ANDERS R., LANZAFAME, PRAVEEN R., **“Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy”**, Photomedicine and Laser Surgery, Vol. 33(4), <http://doi.org/10.1089/pho.2015.9848>, 2015.

ANDO T., XUAN W., XU T., DAI T., SHARMA S., KHARKWAL G., HUANG Y., WU O., WHALEN M., SATO S., OBARA M., HAMBLIN M., **“Comparison of therapeutic effects between pulsed and continuous wave 810-nm wavelength laser irradiation for traumatic brain injury in mice”**, PLoS One, Vol. 6, 2011.

ALZHEIMER’S DISEASE INTERNATIONAL (ADI), **“World Alzheimer Report 2020: Design, Dignity, Dementia: Dementia-related design and the built environment”**, London: Alzheimer’s Disease International. 2020.

ALZHEIMER’S DISEASE INTERNATIONAL (ADI), **“World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia”**, London: Alzheimer’s Disease International. 2019.

ALZHEIMER’S DISEASE INTERNATIONAL (ADI). **“World Alzheimer Report 2015: the global impact of dementia - an analysis of prevalence, incidence, cost and trends”**. London: Alzheimer’s Disease International. 2015.

ARIAS A., ADASME T., SANCHEZ G., MUÑOZ P., HIDALGO C., **“Aging impairs hippocampal- dependent recognition memory and LTP and prevents the associated RyR Up-regulation”**, Front Aging Neurosci, Vol. 9, 2017.

ARIAS N., MENDEZ M., ARIAS J. **“The recognition of a novel-object in a novel context leads to hippocampal and parahippocampal c-Fos involvement”**. Behav Brain Res.; Vol. 292(44). 2015.

ARRIVE GUIDELINES ORG. **“The ARRIVE guidelines 2.0”** disponível em: <https://arriveguidelines.org/>, revisado o 25 de setembro de 2022.

BARTSCH T., WULFF P., **“The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability”**, Neuroscience, Vol. 309, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>, 2015.

BLASER R, HEYSER C. **“Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory”**. Front Behav Neurosci , Vol. 9. 2015.

BERGADO J., MORGAN L., GAL R., **“Emotional tagging—A simple hypothesis in a complex reality”**, Progress in Neurobiology, Vol. 94 (1), <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.004>, 2011.

BERMAN M., HALPER J., NICHOLS T., JARRETT H., LUNDY A., HUANG J., **“Photobiomodulation with near infrared light helmet in a pilot, placebo controlled clinical trial in dementia patients testing memory and cognition”**, J. Neurol. Neurosci., Vol. 8, 2017.

BORGOMANERI S., BATTAGLIA S., GAROFALO S., TORTORA F., AVENANTI A., DI PELLEGRINO G., **“State-Dependent TMS over Prefrontal Cortex Disrupts Fear-Memory Reconsolidation and Prevents the Return of Fear”**, Curr. Biol., Vol. 30, 2020.

BUENDÍA D., GUNCAY T., OYANEDEL M., LEMUS M., WEINSTEIN A., ARDILES Á., MARCOS J., FERNANDES A., ZÂNGARO R., MUÑOZ P., **“The Transcranial Light Therapy Improves Synaptic Plasticity in the Alzheimer’s Disease Mouse Model”**, Brain Sciences., Vol. 12(10), <https://doi.org/10.3390/brainsci12101272>, 2022.

CARNEIRO A., **“Terapia LED Transcraniana na reabilitação de pacientes vítimas de traumatismo crânio encefálico”**, Tese de doutorado em Engenharia Biomédica, Universidade Anhembí Morumbi. 2019.

CASTRÉN, E., ANTILA, H. **“Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses”**, Mol Psychiatry, Vol. 22, <https://doi.org/10.1038/mp.2017.61>, 2017.

CHAO L., **“Effects of home photobiomodulation treatments on cognitive and behavioral function, cerebral perfusion, and resting-state functional connectivity in patients with dementia: A pilot trial”**, Photomed. Laser Surg, Vol. 37, 2019.

CHEN A., ARANY P., HUANG Y., TOMKINSON E., SHARMA S., KHARKWAL G., SALEEM T., MOONEY D., YULL F., BLACKWELL T., HAMBLIN M., **“Low-Level Laser Therapy Activates NF- κ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts”**, PLoS One, Vol. 6(7), doi:10.1371/journal.pone.0022453, 2011

CHEN R., WANG Z., ZHI Z., TIAN J., ZHAO Y., SUN J., **“Targeting the TLR4/NF- κ B pathway in β -amyloid-stimulated microglial cells: A possible mechanism that oxysophoridine exerts anti-oxidative and anti-inflammatory effects in an in vitro model of Alzheimer’s disease”**, Brain Res. Bull, Vol. 175, 2021.

CHEN Y., FU A., IP N., **“Synaptic dysfunction in alzheimer’s disease: Mechanisms and therapeutic strategies”**, Pharmacol. Ther., Vol. 195, 2019.

CHO G., LEE S., PARK J., KIM M., PARK K., CHOI B., SHIN Y., **“Photobiomodulation using a low-level light-emitting diode improves cognitive dysfunction in the 5xfad mouse model of alzheimer’s disease”**, Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci, Vol. 75, 2020.

COMEROTA M., KRISHNAN B., TAGLIALATELA G., **“Near infrared light decreases synaptic vulnerability to amyloid beta oligomers”**, Sci. Rep, Vol. 7, 2017.

COTELLI M., MANENTI R., BRAMBILLA M., PETESI M., ROSINI S., FERRARI C., ZANETTI O., MINIUSI C., **“Anodal tDCS during face-name associations memory training in Alzheimer’s patients”**, Front. Aging Neurosci. Vol. 6 (38), 2014.

CUMMINGS J., LEE G., RITTER A., SABBAGH M., ZHONG K., **“Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2019”**, Alzheimer’s Dement., Vol. 5, 2019.

CUSTODIO N., WHEELOCK A., THUMALA D., SLACHEVSKY A., **“Dementia in latin america: Epidemiological evidence and implications for public policy”**, Front. Aging Neurosci., Vol. 9, 2017.

CROUS M., MINGUILLON C., GRAMUNT, N., MOLINUEVO J., **“Alzheimer’s disease prevention: From risk factors to early intervention”**, Alzheimer’s Res. Ther., Vol. 9, 2017.

DADALTO, VARANDA E., CAVALCANTE F., **“O lugar do cuidador familiar de idosos com doença de Alzheimer: uma revisão de literatura no Brasil e Estados Unidos”**. Ciência & Saúde Coletiva, 26(1), <https://dx.doi.org/10.1590/1413-81232020261.38482020>, 2021.

DA LUZ E., SALGADO A., ZÂNGARO R., DA SILVA M., KERPPERS I., DA SILVA L., PARREIRA R., **“Transcranial led therapy on amyloid-toxin 25–35 in the hippocampal region of rats”**, Lasers Med. Sci, Vol. 32, 2017.

DEARDORFF W., FEEN E., GROSSBERG G., **“The use of cholinesterase inhibitors across all stages of alzheimer’s disease”**. Drugs Aging, Vol. 32, 2015.

DE FREITAS L., HAMBLIN M., **“Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy”**. IEEE J. Quantum Electron, Vol. 22, 2016.

DE SOUSA M., CORDEIRO N., MATEUS E., **“Transcranial photobiomodulation therapy for pain: animal models, dosimetry, mechanisms, perspectives”**. In Photobiomodulation in the Brain, 1st ed.; Hamblin, M., Huang, Y., Eds.; Academic Press: London, UK, pp. 272 – 283., 2019.

DE TABOADA L., HAMBLIN M., **“Transcranial photobiomodulation treats alzheimer’s disease in amyloid-protein precursor transgenic Mice”**. In Photobiomodulation in the Brain, 1st ed.; Hamblin, M., Huang, Y., Eds.; Academic Press: London, UK, pp. 207–212., 2019.

DEMENTIA RESEARCH GROUP. **“Methodological issues for Population-based Research into Dementia in Developing Countries”**. A Position Paper from the 10/66 Dementia Research Group. Intern J Geriat Psych;Vol. 15. 2000.

DENNINGER, J., SMITH, B., KIRBY, E., **“Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget”**, J Vis. Exp. Vol. 141, doi:10.3791/58593, 2018.

DERE E., HUSTON J., DE SOUZA M.. **“The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents”**. Neurosci Biobehav Rev; Vol. 31(5), 2007.

DESMET, K., PAZ, D., CORRY J, et al. **“Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation”**. Photomed Laser Surg. Vol. 24, 2006.

DIX SL, AGGLETON JP. “Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition”. Behav Brain Res.;99(2):191-200. 1999.

ENA X., QIANG C., AARON L., HAO Y., KAITLIN H., BRAD Z., SAUMITRA D., BHASKAR K., JOSEPH H., DWIGHT D., KAREN F., WEINBERGER D., VENKATA S., **“Late-Onset Alzheimer’s Disease Polygenic Risk Profile Score Predicts Hippocampal Function”**, Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging, Vol. 2 (8), <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2017.08.004>. 2017.

ENNACEUR A. **“One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues”**, Behav Brain Res, Vol. 215(2), 2010.

FELLING R., SONG H., **“Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery”**, Exp. Neurol., Vol. 268, 2015.

FERREIRA M., SILVA D., ALVES D., ALVES S., FELÍCIO D., BARBOSA L., SILVA., CARDOSO T., DA SILVA O., MARTINS T., MAGALHAES D., SANTOS B., MARQUES P., BARROS M., **“Caracterização epidemiológica da mortalidade por Alzheimer no Brasil entre 2010 a 2019”**, Research, Society and Development, Vol. 10 (11), DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19316>, 2021.

FRIGERIO S., WOLFS L., FATTORELLI N., THRUPP N., VOYTYUK I., SCHMIDT I., MANCUSO R., CHEN W., WOODBURY M., SRIVASTAVA G., et al. **“The major risk factors for alzheimer’s disease: Age, sex, and genes modulate the microglia response to a plaques”**, Cell Rep., Vol. 27, 2019.

GARY E., HSUEH M., **“Oxidative stress in Alzheimer's disease”**. Neurobiol Aging; Vol. 26 (575). 2005.

GARRE O., **“Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias”**, Revista de Neurología, Vol. 66(11). DOI:10.33588/rn.6611.2017519, 2018.

GAUTHIER S., CO L., WEBSTER C., STIJN S., MORAIS J., ROSA P., **“World Alzheimer Report 2022 Life after diagnosis: Navigating treatment, care and support”** , Alzheimer’s Disease International, Disponible en: <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2022.pdf>, revisado el el 22 de septiembre del 2022. 2022.

GENGLER, A., HÖLSCHER C., **“Synaptic Plasticity in the Hippocampus of a APP/PS1mMouse Model of Alzheimer’s Disease Is Impaired in Old but Not Young Mice”**, PLoS One, Vol. 5 (3), 2010.

GOTTESMAN R., SCHNEIDER A., ZHOU Y., CORESH J., GREEN E., GUPTA N., KNOPMAN D., MINTZ, A., RAHMIM A., SHARRETT A., et al. **“Association between midlife vascular risk factors and estimated brain amyloid deposition”**, JAMA., Vol. 317, 2017.

HAINES J., **“Alzheimer disease: Perspectives from epidemiology and genetics”**, JLME., Vol. 46, 2018.

HAMBLIN M., DE SOUSA M., AGRAWAL T., **“Handbook of low-level laser therapy”**, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd, Singapore. 2016.

HAMBLIN M., **“Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders”**, BBA Clin, Vol. 6, 2016.

HAMBLIN, M. **“Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation”**, Aims Biophys, Vol 4, 2017.

HAMBLIN M., MICHAEL R., **“Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke”**, J Neuro Res., Vol. 96, 2018.

HAMBLIN M., **“Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation”**, Photochem Photobiol., Vol. 94(2), 2018.

HAMBLIN M., **“Photobiomodulation for alzheimer’s disease: Has the light dawned?”**, Photonics., Vol. 6, 2019.

HARDY J., SELKOE D. **“The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics”**, Science , Vol. 297 (353), 2002.

HENDERSON T., MORRIES L., **“Near-infrared photonic energy penetration—principles and practice”**, In Photobiomodulation in the Brain, 1st ed.; Hamblin, M., Huang, Y., Eds.; Academic Press: London, UK, pp. 74 - 95., 2019.

HENNESSY M, HAMBLIN M. **“Photobiomodulation and the brain: a new paradigm”**. J Opt, Vol. 19 (1), doi: 10.1088/2040-8986/19/1/013003, 2017.

HU X., DAS B., HOU H., HE W., YAN R., **“Bace 1 deletion in the adult mouse reverses preformed amyloid deposition and improves cognitive functions”**, Exp. Med., Vol. 215, 2018.

HUANG Y., GUPTA A., VECCHIO D., DE A., HUANG S., XUAN W., HAMBLIN, M., **“Transcranial low level laser (light) therapy for traumatic brain injury”**, Journal of biophotonics, Vol. 5 (11), <https://doi.org/10.1002/jbio.201200077>, 2012.

JABLONSKI., SCHREIBER., WESTBROOK., BRENNAN., STANTON-, **“Determinants of novel object and location recognition during development”**, Behavioural Brain Research, Vol. 256, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.055>, 2013.

JACK C., BENNETT D., BLENNOW K., CARRILLO M., DUNN B., HAEBERLEIN S., HOLTZMAN D., JAGUST W., JESSEN F., KARLAWISH J., et al., **“NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer’s disease”**, Alzheimer’s Dement., Vol. 14, 2018.

JARA C., BUENDÍA D., ARDILES A., MUÑOZ P., TAPIA C., **“Transcranial Red LED Therapy: A Promising Non-Invasive Treatment to Prevent Age-Related Hippocampal Memory Impairment”**, Hippocampus - Cytoarchitecture and Diseases. London, United Kingdom: IntechOpen [Online]. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100620>, 2021.

JEVTIC S., SENGAR A., SALTER M., MCLAURIN J., **“The role of the immune system in alzheimer disease: Etiology and treatment”**, Ageing Res. Rev., Vol. 40, 2017.

JICHA G., CARR S., **“Conceptual evolution in Alzheimer’s disease: Implications for understanding the clinical phenotype of progressive neurodegenerative disease”**, Alzheimer’s Dis., Vol. 19, 2010.

JOHNSTONE C. MORO J. STONE A., BENABID L., MITROFANIS J., **“Turning on lights to stop neurodegeneration: The potential of near infrared light therapy in Alzheimer’s and Parkinson’s Disease,”**, Front. Neurosci, Vol. 9, 2016.

KANDEL E., SCHWARTS J., JESSEL T., **“Principios de neurociencia”**, Cuarta edición, Editorial Mc Graw Hill – Interamericana, Parte VIII, Cap. 58. Pag. 1149 – 1161. 2001. ISBN: 84-486-0311-7. 2001.

KEMPEL A., DOZZI B., **“Knowledge about Alzheimer’s disease in the Brazilian population”**, Arq Neuropsiquiatr. Vol. 76(11), DOI:10.1590/0004-282X20180106, 2018.

KILKENNY C., BROWNE W., CUTHILL I., EMERSON M., ALTMAN D., **“Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research”**, PLoS Biol, Vol. 8 (6) <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>, 2010.

KNOPMAN D., PETERSEN R., JACK C., **“A brief history of "alzheimer disease": multiple meanings separated by a common name”**. *Neurology*, Vol. 92, <https://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000007583>. 2019.

KNOPMAN D., JONES D., GREICIUS M., **“Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the emerge and engage trials as reported by biogen, december 2019”**, *Alzheimer’s Dement.*, Vol. 17, 2019.

KUHN M., POPOVIC A., PEZAWAS L., **“Neuroplasticity and memory formation in major depressive disorder: An imaging genetics perspective on serotonin and BDNF”**, *Restor. Neurol. Neurosci.*, Vol. 32, 2014.

LI K., WEI Q., LIU F., HU F., XIE A., ZHU L., LIU D., **“Synaptic dysfunction in alzheimer’s disease: A β , tau, and epigenetic alterations”**, *Mol. Neurobiol.* Vol. 55, 2018.

LI X., LIU C., WANG R., **“Light modulation of brain and development of relevant equipment”**, *J. Alzheimer’s Dis*, Vol. 74, 2020.

LIM L., **“The Growing Evidence for Photobiomodulation as a Promising Treatment for Alzheimer’s Disease”**, *Int. J. Biosci. Med.*, Vol. 6, 2018.

LINS R., DANTAS M., LUCENA, K., CATÃO M., GRANVILLE G., NETO L., **“Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo”** *An. Bras. Dermatol.* Vol. 85 (6), 2010.

LONG J., HOLTZMAN D., **“Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies”**, *Cell.*, Vol. 179, 2019.

MANZANO J., GONZÁLEZ A., MARCOS M., PAYNO C., VILLANUEVA., MATÍAS G., **“Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer”** *Neurología*, Vol. 24(4), 2009.

MASSIMO S., MICHAEL H., **“Electrophysiology in the age of light”**. *Nature*, Vol 461 (5), doi:10.1038/nature08540PDF, <http://pyramidal.stanford.edu/news/nature-V461-Oct2009-Electrophys.pdf>, 2009.

MCCARTHY T., DE TABOADA L., HILDEBRANDT P., ZIEMER E., RICHIERI S., STREETER J., **“Long-Term Safety of Single and Multiple Infrared Transcranial Laser Treatments in Sprague–Dawley Rats”**, *Photomedicine and Laser Surgery*, Vol. 28 (5), 2010.

MATHIS D., FURMAN, J., NORRIS, C., **“Preparation of Acute Hippocampal Slices from Rats and Transgenic Mice for the Study of Synaptic Alterations during Aging and Amyloid Pathology”**, J. Vis. Exp. Vol. (49), doi:10.3791/2330, 2011.

MIELKE M., VEMURI P., ROCCA W., **“Clinical epidemiology of alzheimer’s disease: Assessing sex and gender differences”**, Clin. Epidemiol., Vol. 6, 2014.

MIZIAK B., BŁASZCZYK B., CZUCZWAR S., **“Some Candidate Drugs for Pharmacotherapy of Alzheimer’s Disease”**, Pharmaceuticals., Vol. 14, 2021.

MOURELLE C., HERRERO E., RICCA M., **“Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio”**. Spei Domus, Vol. 9(19), <https://doi.org/10.16925/sp.v9i19.708>, 2013.

MUÑOZ D., **“Generación de nuevos modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer”**, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular, Universidad autónoma de Madrid. Disponible en: [file:///Users/pabloAir/Downloads/61328_Mu%C3%B1oz%20Santos%20Diego%20\(1\).pdf](file:///Users/pabloAir/Downloads/61328_Mu%C3%B1oz%20Santos%20Diego%20(1).pdf), Revidado el 22 de septiembre del 2022. 2012.

MUÑOZ P., ESTAY C., DIAZ P., ELGUETA C., ARDILES A., LIZANA PA., **“Inhibition of DNA methylation impairs synaptic during an early time window in rats”**. Neural Plast. Vol. 20 (16), <https://doi.org/10.1155/2016/4783836>, 2016.

NAESER M., MARTIN P., HO M., KRENGEL M., BOGDANOVA Y., KNIGHT J., YEE M., ZAFONTE R., FRAZIER J., HAMBLIN M., KOO B., **“Transcranial, Red/Near-Infrared Light-Emitting Diode Therapy to Improve Cognition in Chronic Traumatic Brain Injury”**, Photomed Laser Surg., Vol. 34 (12), 2016.

NIU H., ÁLVAREZ A., GUILLÉN F., AGUINAGA I., **“Prevalence and incidence of alzheimer’s disease in europe: A meta-analysis”**, Neurología, Vol. 32, 2017.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), **“Plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia 2017-2025”**, Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259615> . Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Disponible en: <http://www.who.int>. Revisado: 27/07/2020. 2020.

PEÑA C., **“Enfermedad de Alzheimer. Del diagnóstico a la terapia: Conceptos y hechos”**, Editor: Fundación “la Caixa”. Disponible en:

https://fiapam.org/wp-content/uploads/2012/10/Enfermedad_Alzheimer_de_diagnostico_a_terapia.pdf Revisado el 22 de septiembre del 2022. 1999.

PROAÑO J., AGUILAR F., **“Enfermedad de Alzheimer: Clínica, diagnóstico y neuropatología patológica”**, Rev. Plasticidad y Restauración Neurológica, Vol. 3 (1), Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/plasticidad/prn-2004/prn041_2m.pdf revisado el 3 de marzo del 2021. 2004.

PRUTHI S., ACOSTA A., ARORA A., **“Enfermedad de Alzheimer: los medicamentos ayudan a controlar los síntomas”**, Mayo Clinic, Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048103>, revisado el 20 de noviembre del 2022. 2022.

PURUSHOTHUMAN S., JOHNSTONE D., NANDASENA C., MITROFANIS J., STONE J., **“Photobiomodulation with near infrared light mitigates alzheimer’s disease-related pathology in cerebral cortex—evidence from two transgenic mouse models”**, Alzheimer’s Res. Ther., Vol. 6 (2), 2014.

QUIRK B., TORBEY M., BUCHANANN E., VERMA S., WHELAN H., **“Near infrared photobiomodulation in animal model of traumatic brain injury: Improvements at the behavioral and biochemical levels”**. Photomed Laser Surg. Vol. 30, 2012.

RAMEZANI F., NESHASTEH A., GHADAKSAZ A., FAZELI S., JANZADEH A., HAMBLIN M., **“Mechanistic aspects of photobiomodulation therapy in the nervous system”**, Lasers Med. Sci., Vol., 37, 2021.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA, **“modelo | Definición de modelo - «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario”**. [Online]. Available: <https://dle.rae.es/?id=PTk5Wk1>. [Accessed: 11- Jun-2019]. 2022.

REYNALDO G., PARDO G., GUEVARA M., CASCUDO N., CARRASCO M., **“Teorías acerca de los mecanismos celulares y moleculares en la enfermedad de Alzheimer”**, Revista Cubana de Medicina., Vol. 47(3), 2008.

RIBE E., PÉREZ M., PUIG B., GICH I., LIM F., CUADRADO M., et al., **“Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice”**. Neurobiol Dis. Vol. 20(3), 2005.

ROA M., “**Los casos de demencia podrían ser más frecuentes en el futuro**”. Statista Research Department., Disponível em: <https://es.statista.com/grafico/28296/numero-estimado-de-personas-con-demencia-por-cada-1000-habitantes/>, revisado em outubro de 2022.

SALAZAR P., MANTEROLA C., QUIROZ G., GARCÍA N., OTZEN T., MORA M., DUQUE G., “**Estudios de cohortes. 1ª parte. Descripción, metodología y aplicaciones**” Rev. cir, Vol. 71(5), DOI: <http://dx.doi.org/10.35687/s2452-45492019005431>, 2019.

SALEHPOUR F., AHMADIAN N., HOSSEIN S., FARHOUDI M., KARIMI P., SADIGH-ETEGHAD S., “**Transcranial low-level laser therapy improves brain mitochondrial function and cognitive impairment in D-galactose-induced aging mice**”. Neurobiol Aging, Vol. 58, 2017.

SALEHPOUR F., DE TABOADA L., CASSANO P., KAMARI F., MAHMOUDI J., AHMADI S., RASTA S., SADIGH S., “**A Protocol for Transcranial Photobiomodulation Therapy in Mice**”, J. Vis. Exp., Vol. 141, doi:10.3791/59076, 2018.

SALEHPOUR F., MAHMOUDI J., KAMARI F., SADIGH-ETEGHAD S., RASTA S., HAMBLIN M., “**Brain Photobiomodulation Therapy: a Narrative Review**”, Mol Neurobiol., Vol. 55 (8), doi:10.1007/s12035-017-0852-4, 2018.

SALGADO S., PARREIRA R., CECI L., DE OLIVEIRA L., ZÂNGARO R., “**Transcranial Light Emitting Diode Therapy (TCLT) and its Effects on Neurological Disorders**”, J Bioengineer & Biomedical Sci, Vol. 5(144). doi:10.4172/2155- 9538.1000144, 2015.

SALTMARCHE E., NAESER, M., HO K., HAMBLIN M., LIM L., “**Significant improvement in cognition in mild to moderately severe dementia cases treated with transcranial plus intranasal photobiomodulation: Case series report**”, Photomed. Laser Surg, Vol. 35, 2017.

SAMPERI R., FERNANDEZ C., BAPTISTA M., “**Metodología de la investigación**”, Mc Graw Hill, 5ta edición, ISBN: 978-607-15-0291-9, México, 2014.

SÁNCHEZ M., “**Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos**”. Disponible en: file:///Users/pabloAir/Downloads/TD_Sanchez_Mejias.pdf. Acceso en 22 de septiembre del 2022, 2015.

SARAH E., CHARLES M., JASON H., CATHERINE M., NIGEL J., JOHN C., WALTER K., **“Neuropsychological changes in asymptomatic persons with Alzheimer disease neuropathology”**, Neurology., Vol. 83, 2014.

SERRANO A., QIAN J., MONSELL S., BLACKER D., GÓMEZ T., BETENSKY R., HYMAN B., **“Mild to moderate Alzheimer dementia with insufficient neuropathological changes”**, Ann. Neurol., Vol. 75, 2014.

SHEN L., LIU X., GU D., XING D., **“Photobiomodulation suppresses jnk3 by activation of erk/mkp7 to attenuate ampa receptor endocytosis in alzheimer’s disease”**, Aging Cell, Vol. 20, 2021.

SORIANO C., GUILLAZO B., **“Fundamentos de neurociencia”**, Editorial UOC, Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=d8F3gASc8AIC&oi=fnd&pg=PA5&dq=C.+Soriano+Mas+and+G.+Guillazo+Blanch,+Fundamentos+de+neurociencia.+Editorial+UOC,+2007.&ots=87nO16wRwZ&sig=h8WBOvE1AfDTJTGQkQhBBZWWvdl#v=onepage&q=C.%20Soriano%20Mas%20and%20G.%20Guillazo%20Blanch%2C%20Fundamentos%20de%20neurociencia.%20Editorial%20UOC%2C%202007.&f=false>, revisado el 4 de febrero del 2021. 2007.

THOMAS G., LIN D., NURIYA M., HUGANIR R., **“Rapid and bidirectional regulation of ampa receptor phosphorylation and trafficking by jnk”**. EMBO Rep, Vol. 27, 2021.

TOMASZCZYK J., GREEN N., FRASCA D., COLELLA B., TURNER G., CHRISTENSEN B., GREEN R., **“Negative neuroplasticity in chronic traumatic brain injury and implications for neurorehabilitation”**, Neuropsychol. Rev., Vol. 24, 2014.

TÖRÖK N., TANAKA M., VÉCSEI L., **“Searching for Peripheral Biomarkers in Neurodegenerative Diseases: The Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway”**, Int. J. Mol. Sci., Vol. 21, 2020.

VARGAS E., BARRETT D., SAUCEDO C., HUANG L., ABRAHAM J., TANAKA H., HALEY A., GONZALEZ F., **“Beneficial neurocognitive effects of transcranial laser in older adults”**, Lasers Med. Sci., Vol. 32, 2017.

VAZ M., SILVESTRE S., **“Alzheimer’s disease: Recent treatment strategies”**, Eur. J. Pharmacol, Vol. 887, 2020.

VILLEMAGNE V., PIKE K., CHÉTELAT G., ELLIS K., MULLIGAN R., BOURGEAT P., ROWE C., **“Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease”**, Ann. Neurol., Vol. 69, 2011.

VILLEMAGNE V., BURNHAM S., BOURGEAT P., BROWN B., ELLIS K., SALVADO O., MASTERS C., **“Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer’s disease: A prospective cohort study”**. *Lancet Neurol.*, Vol. 12, 2013.

WILCOCK G., HOWE I., COLES H., LILIENFELD S., TRUYEN L., ZHU Y., BUL-LOCK R., KERSHAW P., **“A long-term comparison of galan-tamine and donepezil in the treatment of alzheimer’s disease”**, *Drugs Aging*, Vol. 20, 2003.

WIMMER M., HERNANDEZ P., BLACKWELL J., ABEL T., **“Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice”**, *Neurobiology of Aging*, Vol. 33 (9), <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.007>, 2012.

YAN S., STERN D.. **“Mitochondrial dysfunction and Alzheimer’s disease: role of amyloid-b peptide alcohol dehydrogenase (ABAD)”**, *Int J Exp Pathol*, Vol. 86 (161), 2005.

YIANNOPOULOU K., PAPAGEORGIU S., **“Current and future treatments in alzheimer disease: An update”**, *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.*, Vol. 12, 2020.

YUE X., MEI Y., ZHANG Y., TONG Z., CUI D., YANG J., WANG A., WANG R., FEI X., AI L., DI Y., LUO H., LI H., LUO H., LU H., LI R., DUAN R., GAO G., YANG H., SUN B., HE R., SONG W., HAN H., TONG Z., **“New insight into Alzheimer’s disease: Light reverses Abeta-obstructed interstitial fluid flow and ameliorates memory decline in APP/ PS1 mice”**, *Alzheimers Dement.*, Vol. 5, 2019.

YUNLONG L., **“Establishment of experimental models for Alzheimer’s disease research”**, *International Journal of Neuroscience*, Vol. 123 (12), DOI: 10.3109/00207454.2013.804821, 2013.

ZHANG Z., SHEN Q., WU X., ZHANG D., XING D., **“Activation of PKA/SIRT1 signaling pathway by photobiomodulation therapy reduces a β levels in alzheimer’s disease models”**, *Aging Cell*, Vol. 19, 2020.

ZHANG Z., SHEN Q., WU X., ZHANG D., XING D., **“Activation of PKA/SIRT1 signaling pathway by photobiomodulation therapy reduces a β levels in alzheimer’s disease models”**, *Aging Cell*, Vol. 19, 2020.

ZHAO W., SANTINI F., BREESE R., ROSS D., ZHANG X., STONE D., FERRER M., TOWNSEND M., WOLFE A., SEAGER M., et al. **“Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid β oligomer-induced synaptic disruption”**, *J. Biol. Chem*, Vol. 285, 2010.

ZURITA C., NALLELY J., BARBOSA C., VILLASÍS K., **“De la investigación a la práctica: fases clínicas para el desarrollo de fármacos”** Revista alergia México, Vol. 66 (2), DOI: 10.29262/ram.v66i2.625, 2019.

ANEXOS

ANEXO 1



CBI – Facultad de Farmacia

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA ANIMALES – 02/2021 (Solicitud 02/2021)

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Raúl Vinet (Miembro del CBI), Prof. Marcela Escobar (Secretario del CBI) y Prof. María Carolina Henríquez (Miembro del CBI) declara haber realizado la evaluación del protocolo experimental del proyecto "Efecto de la terapia de luz transcraneana (TLTC) de 630 nm, sobre la memoria de reconocimiento y la plasticidad sináptica en modelo de ratón portador de Enfermedad de Alzheimer", presentado por la investigadora Débora Alicia Buendía Palacios, de la Escuela de Ingeniería Civil Biomédica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Valparaíso.

Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes enviados por la investigadora y que incluyen: (1) curriculum vitae de la investigadora (2) apego a las pautas bioéticas establecidas en el documento denominado "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA ANIMALES" (versión 09-2016) y (3) Proyecto.

Objetivo del Estudio. La investigación propone Demostrar que la Terapia de luz transcraneana de luz roja a 630 nm mejora la memoria de reconocimiento y la plasticidad sináptica en la LTD y la LTP de neuronas hipocámpales en las sinapsis de CA3 a CA1, en ratones portadores de enfermedad de Alzheimer.

Metodología. Es un estudio pre-clínico experimental, cuantitativo y correlacional que analiza el efecto de la TLTC sobre un modelo murino de Enfermedad de Alzheimer comparado con ratones tipo WT. Los ratones serán divididos en 2 grupos (control y experimental, este último será el que recibirá la TLTC). El tratamiento de TLTC consiste en la exposición a luz roja a 630 nm, durante 125 s diarios durante 5 días consecutivos (sin contar finales de semana), durante 5 semanas. Esto por medio de un dispositivo de TLTC diseñado en la EICB de la UV. Para la evitar el estrés de los animales se diseñó una caja contenedora con una abertura en la parte superior que permite la irradiación. Luego del período de tratamiento se realizarán las pruebas conductuales, una vez finalizadas estas, los ratones serán anestesiados con Halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano, con 99% pureza de Sigma-Aldrich) y posteriormente se realizará eutanasia por decapitación para extraer el cerebro y obtener los hipocámpos que se utilizarán para los estudios de campo por electrofisiología observando variables como LTP y LTD. Para determinar número de la muestra se tuvo en cuenta el principio de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). Para dar robustez estadística y mayor reproducibilidad de los datos se realizó un análisis estadístico de "análisis de poder" para determinar el tamaño de la muestra. Considerando este análisis estadístico, el número de animales a utilizar para dar cumplimiento a los Objetivos 1 y 2 es de 24 animales.

- I. El CBI considera que el objetivo general ha sido bien definido y que la metodología asociada al uso de animales de experimentación ha sido bien establecida.
- II. En la valoración bioética del proyecto, el CBI no presenta objeciones al protocolo de manejo de los especímenes murinos resguardándose los principios éticos de:
 - a) Brindar los cuidados adecuados a los especímenes murinos.
 - b) Evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas.

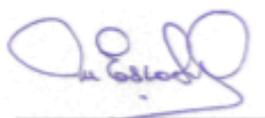
Acta CBI A 02/2021

- c) Evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos.
 - d) Reducir al mínimo indispensable el número animales para garantizar la validez del estudio a realizar.
- III. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia APRUEBA el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

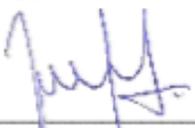
Firman el Acta los miembros del Comité:



Rafael Jiménez



Marcela Escobar



Ma. Carolina Henríquez



Sergio Blaimont



Raúl Vinet

Valparaíso, 8 de noviembre de 2021.