

Artigo

A Irradiação Sanguínea Intravascular a Laser (ILIB) Aprimora Atividade antioxidante e metabolismo energético em ovários envelhecidos

 Li-Te Lin ^{1,2,3,4}, Chia-Jung Li ^{1,2,3}, Chyi-Uei Chern ¹, Pei-Hsuan Lin ¹, Po Wen Lin ¹, Yu Chen Chen ¹,
 Hsiao-Wen Tsai¹ e Kuan-Hao Tsui ^{1,2,3,4,5,6,*} 

¹ Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital Geral de Veteranos de Kaohsiung, Kaohsiung 813, Taiwan;
² Departamento de Enfermagem, Faculdade Júnior de Medicina e Administração Shu-Zen, Kaohsiung 821,
³ Taiwan; Instituto de Ciências Biofarmacêuticas, Universidade Nacional Sun Yat-sen, Kaohsiung 804,
⁴ Taiwan; Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina da Universidade Nacional
 Yang-Ming, Taipei
⁵ 112, Taiwan; Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital Geral de Veteranos de Taipei,
⁶ Taipei 112, Taiwan; Departamento de Medicina, Hospital Geral Tri-Service, Centro Médico de Defesa Nacional,
 Taipei 114, Taiwan. * Correspondência: khtsui@vghks.gov.tw

Resumo: Introdução: O envelhecimento ovariano é caracterizado pelo acúmulo de radicais livres, levando a danos teciduais e afetando a saúde reprodutiva. A irradiação intravascular do sangue com laser (ILIB, utilizando um laser He-Ne de baixa energia) é conhecida por sua eficácia no tratamento de doenças vasculares, reduzindo radicais livres e inflamação. No entanto, seu impacto no envelhecimento ovariano permanece incerto. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do ILIB no estresse oxidativo e no metabolismo energético em ovários envelhecidos. Métodos: Foi realizada análise genética em 75 pacientes inférteis com ovários envelhecidos, divididas em grupos tratados com ILIB e controle (CTRL). As pacientes foram submetidas a dois ciclos de tratamento a laser e os parâmetros clínicos foram avaliados. Células do cumulus foram coletadas para análise genética da oxeiptose, glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Resultados: A análise dos padrões de expressão gênica revelou achados intrigantes em pacientes tratadas com ILIB em comparação ao grupo não tratado. Notavelmente, o tratamento com ILIB resultou em uma regulação positiva significativa dos genes AIFM1 e NRF2, relacionados à oxeiptose, sugerindo um potencial efeito protetor contra a morte celular induzida por estresse oxidativo. Além disso, o tratamento com ILIB levou a uma regulação negativa do gene hexocinase 2 (HK2), associado à glicólise, indicando uma mudança do metabolismo anaeróbico para o aeróbico, juntamente com um aumento nos níveis de PDHA, indicativo de melhora da função mitocondrial. Em consonância com essas alterações, os pacientes tratados com ILIB apresentaram expressão elevada dos principais genes do ciclo do TCA, citrato sintase (CS), subunidade A do complexo da succinato desidrogenase (SDHA) e fumarato hidratase (FH), o que indica melhora. Conclusão: Os resultados deste estudo reforçam o potencial do ILIB como estratégia terapêutica para atenuar o envelhecimento ovariano. Ao combater o estresse oxidativo e melhorar o metabolismo energético, o ILIB demonstra potencial para preservar a função ovariana e a saúde reprodutiva em mulheres idosas. Mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos subjacentes e otimizar a aplicação do ILIB na prática clínica, com o objetivo final de melhorar os resultados de fertilidade em mulheres que apresentam declínio ovariano relacionado à idade.

Palavras-chave: ILIB; envelhecimento ovariano; oxeiptose; metabolismo energético



Citação: Lin, L.-T.; Li, C.-J.; Chern, C.-U.; Lin, P.-H.; Lin, P.-W.; Chen, Y.-C.; Tsai, H.-W.; Tsui, K.-H.
 Irradiação sanguínea a laser intravascular
 (ILIB) Aumenta a atividade antioxidante e o
 metabolismo energético em ovários
 envelhecidos. *J. Pers. Med.* **2024**, *14*, 551. <https://doi.org/10.3390/jpm14060551>

Editor Acadêmico: Konstantinos
 Stamatakis

Recebido em: 23 de abril de 2024

Revisado em: 20 de maio de 2024

Aceito em: 20 de maio de 2024

Publicado em: 22 de maio de 2024



Direitos autorais: © 2024 pelos autores.
 Licenciado pela MDPI, Basileia, Suíça.

Este artigo é um artigo de acesso aberto,
 distribuído sob os termos e

Condições do Creative Commons

Licença de atribuição (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.0/).

1. Introdução

O envelhecimento ovariano representa um fenômeno fisiológico natural caracterizado por uma deterioração gradual da função reprodutiva, particularmente evidente em mulheres com 35 anos ou mais [1,2]. Esse processo se manifesta como diminuição da reserva ovariana, comprometimento da qualidade dos oócitos e aumento da ocorrência de anormalidades cromossômicas. Juntos, esses fatores contribuem para a redução da fertilidade e maior vulnerabilidade à infertilidade, bem como a complicações durante a gravidez [2–4]. Diversos fatores contribuem para esse declínio associado à idade, incluindo a diminuição da função mitocondrial e da capacidade antioxidante tanto no ovário quanto no ov

oócito e células da granulosa do cumulus circundante [5–8]. As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na produção de energia celular por meio da fosforilação oxidativa, atuando como reguladores vitais do metabolismo energético, da homeostase metabólica e do gerenciamento do estresse oxidativo, exercendo, assim, influência significativa sobre os processos de envelhecimento reprodutivo. Nas células germinativas, as mitocôndrias desempenham funções indispensáveis no suporte a processos que demandam muita energia, como a maturação do oócito, a fertilização e o desenvolvimento embrionário subsequente [9–13].

Na análise de dados do mundo real, tornou-se evidente que indivíduos categorizados como respondedores adversos esperados, mais jovens ou mais velhos, apresentaram taxas cumulativas de parto notavelmente menores em comparação com aqueles classificados como respondedores normais (29,4% vs. 12,5% vs. 50,6%, respectivamente) [14]. O risco de encontrar baixa resposta ovariana (BRO) durante ciclos subsequentes de fertilização *in vitro* (FIV) foi de aproximadamente 11,5%, com um risco substancialmente elevado observado entre mulheres com baixa reserva ovariana, apresentando BRO novamente em 57% dos casos dentro de um ano após as tentativas iniciais de FIV [15]. Além disso, uma proporção significativa de ciclos (13,3%) não produziu embriões de alta qualidade, ressaltando a prevalência de cenários caracterizados por BRO e baixa qualidade embrionária [16]. Essas apresentações clínicas ressaltam a natureza complexa do envelhecimento ovariano, onde a idade cronológica da mulher serve como um preditor fundamental, mas o envelhecimento ovariano prematuro também pode se manifestar, levando à qualidade comprometida dos oócitos e ao subsequente desenvolvimento embrionário deficiente.

A etiologia do envelhecimento ovariano envolve processos multifatoriais, com o estresse oxidativo emergindo como um fator crucial [17]. O estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, pode exercer efeitos deletérios sobre o tecido e a função ovariana, levando, em última instância, à diminuição da reserva ovariana e à qualidade comprometida dos oócitos [18]. Para mitigar as manifestações clínicas associadas ao envelhecimento ovariano, intervenções antioxidantes têm sido exploradas. Essas intervenções abrangem substâncias como as vitaminas C e E, a coenzima Q10 e a melatonina, que visam neutralizar os efeitos nocivos do estresse oxidativo e restaurar a homeostase celular. No entanto, a eficácia dessas intervenções, particularmente em indivíduos com baixa resposta ovariana, tem sido limitada, o que torna necessária a exploração de novas modalidades terapêuticas.

A irradiação intravascular a laser do sangue (ILIB) surgiu como uma abordagem terapêutica promissora para mitigar o estresse oxidativo e a inflamação, bem como para promover a regeneração e o reparo tecidual [20]. A ILIB consiste na exposição do sangue circulante à irradiação a laser de baixa intensidade, um processo conhecido por estimular a atividade mitocondrial, aumentar o metabolismo celular e regular as respostas inflamatórias. Essa modalidade de tratamento envolve direcionar um feixe de laser de baixa intensidade para a corrente sanguínea, onde interage com as células sanguíneas, influenciando potencialmente vários processos fisiológicos [21]. Esses efeitos são atribuídos à ativação de vias de sinalização celular, incluindo a regulação positiva de enzimas antioxidantes e a modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias [22]. Dadas as promissoras propriedades anti-envelhecimento, antioxidantes e anti-inflamatórias da ILIB, nosso estudo visa investigar seus potenciais efeitos terapêuticos em indivíduos com baixa resposta ovariana e baixa qualidade embrionária concomitante.

Em nosso estudo, incluímos 75 pacientes inférteis com sinais de envelhecimento ovariano que foram submetidas ao tratamento com laser de fibra óptica intraluminal (ILIB), que consiste na inserção de uma fibra de laser em uma veia por meio de um cateter. Cada sessão de tratamento teve duração de 60 minutos, com duas sessões administradas com uma semana de intervalo para otimizar a eficácia terapêutica. Nosso protocolo de avaliação abrangente inclui a análise das alterações nos perfis de citocinas pró-inflamatórias, na dinâmica hormonal e nos níveis do hormônio antimülleriano (AMH) antes e depois do tratamento com ILIB. Além disso, analisaremos meticulosamente a quantidade e a qualidade dos oócitos recuperados, as taxas de fertilização, a morfologia embrionária e, por fim, os resultados da gravidez.

Por meio dessa abordagem abrangente, buscamos elucidar o potencial do ILIB como intervenção terapêutica para melhorar os resultados da gravidez em indivíduos com baixa resposta ovariana. Ao promover a regeneração da função mitocondrial, aprimorar o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante e modular as respostas inflamatórias, o ILIB pode oferecer uma nova estratégia terapêutica para indivíduos com baixa resposta ovariana e baixa qualidade embrionária. Além disso, nosso estudo busca aprofundar nossa compreensão sobre a

mecanismos subjacentes envolvidos no envelhecimento ovariano e identificação de potenciais alvos para pesquisas futuras. Intervenções terapêuticas destinadas a otimizar os resultados de fertilidade nessa população de pacientes.

2. Materiais e Métodos

2.1. Pacientes e Desenho

Este estudo prospectivo incluiu pacientes com histórico de pelo menos duas fertilizações in vitro (FIV) anteriores, falhas após a transferência de embriões de boa qualidade no Centro de Reprodução do Hospital Geral de Veteranos de Kaohsiung, em Taiwan, entre junho de 2023 e junho de 2024. Ético A aprovação foi obtida do Comitê de Revisão Institucional do Hospital de Veteranos de Kaohsiung, Hospital Geral (VGHKS23-CT3-20), e todos os participantes forneceram informações por escrito. consentimento. Os autores declaram não haver conflitos de interesse relacionados a quaisquer produtos utilizados neste estudo. Estudo. Participantes com falha de implantação recorrente que se submeteram a fertilização in vitro/embrião. ciclo de transferência utilizando embriões criopreservados e falha em obter gravidez após pelo menos duas transferências de embriões, cada uma envolvendo no mínimo quatro embriões de alta qualidade, foram realizadas. recrutados prospectivamente. Os critérios de inclusão abrangiam (i) idade entre 31 e 44 anos; e (ii) um índice de massa corporal (IMC) $\leq 29 \text{ kg/m}^2$. Os critérios de exclusão incluíram (i) grave endometriose; (ii) anomalia uterina; (iii) adenomiose; e (iv) presença de doença sistêmica doenças como distúrbios autoimunes.

2.2. Protocolo de Tratamento

Os pacientes do grupo tratado com laser foram submetidos à irradiação do sangue venoso utilizando um feixe de hélio-neônio. laser (JC-ILIB-800, Jin-Cheng Medical Company Limited, Taipei, Taiwan). Cada paciente O paciente foi submetido a um protocolo abrangente de tratamento a laser, totalizando 20 sessões. administrado durante um período específico (Figura 1). O protocolo de tratamento começou com Dez sessões de laser, seguidas de um intervalo de uma semana para recuperação e avaliação. Em seguida, os pacientes foram submetidos a mais 10 sessões de laser para completar o tratamento. ciclo. Ao longo de cada sessão, foi utilizado um laser que emite comprimentos de onda de 632,8 nm. A potência de saída do laser foi meticulosamente ajustada durante o processo de tratamento para otimizar o resultado. resultados terapêuticos, priorizando a segurança do paciente. Inicialmente, o laser foi configurado em um potência de saída conservadora de 3,8 mW para a primeira sessão, aumentando progressivamente para 4,1 mW na segunda sessão, 4,4 mW na terceira sessão e 4,7 mW na quarta sessão. sessão. Posteriormente, da quinta à vigésima sessão, uma saída constante. A potência de 5,0 mW foi mantida. Este regime de tratamento a laser personalizado foi desenvolvido. Oferecer intervenção terapêutica precisa, mitigando ao mesmo tempo os potenciais efeitos adversos. Cada A sessão de tratamento foi monitorada de perto para garantir a administração correta do medicamento. A energia do laser maximiza seus efeitos benéficos para pacientes em tratamento para suas doenças. condição específica.

J. Pers. Med. 2024, 14, x PARA REVISÃO POR PARES

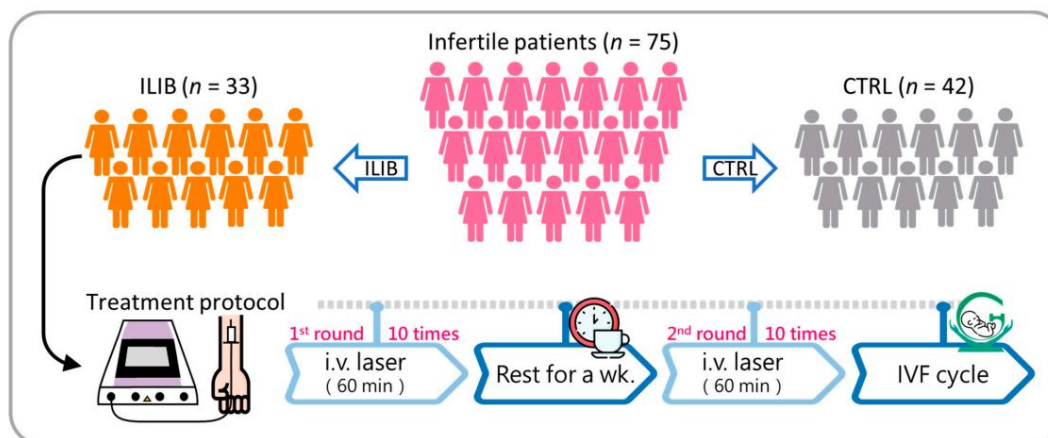


Figura 1. O fluxograma fornece uma representação visual da metodologia sistemática empregada ao longo de todo o processo de pesquisa, para garantir a seleção meticulosa de estudos relevantes para inclusão na análise.

a análise.

2.3. Coleta de células do cumulus dos pacientes

Após a coleta dos oócitos, os complexos cúmulo-oócito da paciente foram coletados e lavados antes de serem colocados em meio de fertilização in vitro (FIV) sob óleo mineral. As células do cúmulo foram tratadas com 40 UI/mL de hialuronidase (SynVitto™ Hyadase, Origo, Knardrupvej, Dinamarca) por 3 minutos e, em seguida, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Após a remoção dos oócitos, as células do cumulus foram dissociadas mecanicamente e lavadas.

2.3. Coleta de células do cumulus dos pacientes

Após a coleta dos oócitos, os complexos cúmulo-oócito da paciente foram coletados e lavados antes de serem colocados em meio de fertilização *in vitro* (FIV) sob óleo mineral. As células do cúmulo foram tratadas com 40 UI/mL de hialuronidase (SynVITRO™ Hyadase, Origo, Knardrupvej, Dinamarca) por 3 minutos e, em seguida, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a remoção dos oócitos, as células do cúmulo foram dissociadas mecanicamente e lavadas novamente. O sedimento de células do cumulus resultante foi ressuspensão em Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 5 mg/L de insulina, 5 mg/L de transferrina, 5 µg/L de selenito de sódio (ITS, Sigma) e 1,25 µM de androstenediona (4-androsteno-3,17-diona, Sigma). As células do cumulus foram então plaqueadas em uma placa de 4 poços na concentração de 2×10^5 células viáveis/poço e cultivadas a 37,5 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ por até 24 horas para experimentos posteriores.

2.4. Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR)

A extração do RNA total seguiu um protocolo padrão utilizando o reagente QIAzol (QIAGEN). A análise de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi realizada utilizando um sistema de detecção de sequência ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA) e o kit de reagentes SYBR Green PCR Core (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA). Experimentos em duplicata foram conduzidos para cada ponto de dados, e amostras que apresentaram um coeficiente de variação para o valor de Ct > 1% foram retestadas. Os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) foram avaliados utilizando ensaios de qRT-PCR baseados em SYBR Green no equipamento StepOne, fabricado pela Applied Biosystems (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA), conhecido por sua precisão e reprodutibilidade na análise da expressão. O gene RNU6-1 foi utilizado como gene de referência para garantir a normalização precisa dos dados de expressão na análise de qRT-PCR.

2.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram submetidos a uma análise rigorosa, abrangendo pelo menos três ensaios experimentais distintos, para garantir confiabilidade e consistência. Todos os dados foram apresentados como média e desvio padrão, a fim de fornecer uma visão abrangente da variabilidade dentro do conjunto de dados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student pareado bicaudal, um método comumente empregado para avaliar a significância das diferenças observadas entre as condições experimentais. Um limiar de $p < 0,05$ foi estabelecido para determinar a significância estatística, garantindo assim robustez e confiabilidade na interpretação dos resultados experimentais.

3. Resultados

3.1. Características Demográficas e Clínicas de Pacientes Inférteis

Uma coorte de 75 indivíduos com infertilidade foi cuidadosamente selecionada no Centro de Fertilização *In Vitro* (FIV) do Hospital Geral de Veteranos de Kaohsiung para participar deste estudo. Esses participantes foram divididos em dois grupos distintos: o grupo controle (CTRL) e o grupo ILIB. Dados demográficos e clínicos detalhados foram meticulosamente coletados e analisados para cada indivíduo. As Tabelas 1 e 2 fornecem uma visão geral abrangente das características basais, incluindo variáveis-chave como idade, IMC, duração da infertilidade, histórico de falhas anteriores de FIV e etiologia da infertilidade. Além disso, vários parâmetros clínicos foram registrados e analisados, como níveis basais de hormônio folículo-estimulante (FSH), estradiol (E2) e hormônio luteinizante (LH); duração da estimulação; número de oócitos recuperados; número de oócitos em metáfase II; taxa de maturação; número de oócitos fertilizados; taxa de fertilização; número de embriões no 3º dia; e número de embriões de alta qualidade no 3º dia.

Tabela 1. Características básicas dos pacientes nos grupos CTRL e ILIB.

Parâmetros	CTRL (n = 42)	ILIB (n = 33)
Idade (anos)	38,9 ± 3,2	39,8 ± 3,4
IMC (kg/m ²)	23,3 ± 4,5	23,1 ± 4,3
Duração da infertilidade (em anos)	4,2 ± 3,3	4,9 ± 3,2
Falha anterior na FIV (n)	1,4 ± 2,3	1,8 ± 1,2
Tipos de infertilidade n (%)		
Infertilidade primária	20/42 (47,6%)	15/33 (45,5%)
Infertilidade secundária	23/43 (53,4%) 9,8	18/33 (54,5%)
FSH basal (UI/L)	± 7,5 112,8	10,9 ± 6,7
E2 basal (pg/mL)	± 148,8 8,4 ±	266,5 ± 394,6
LH basal (UI/L)	13,6	7,6 ± 6,0

FIV, fertilização in vitro; FSH, hormônio folículo-estimulante; E2, estradiol; LH, hormônio luteinizante.

Tabela 2. Resultados das características do ciclo em ambos os grupos.

Parâmetros	CTRL (n = 42)	ILIB (n = 33)
Duração da estimulação (dias)	10,6 ± 2,3	10,3 ± 2,8
Número de oócitos recuperados (n)	5,6 ± 4,2	4,7 ± 3,9
Número de oócitos em metáfase II (n)	4,3 ± 4,2	3,8 ± 3,1
Taxa de maturação (%)	80,7 ± 3,6	84,7 ± 3,8
Número de oócitos fertilizados (n)	3,6 ± 3,5	3,0 ± 2,7
Taxa de fertilização (%)	84,3 ± 3,7	78,8 ± 79,6
Número de embriões no 3º dia (n)	3,3 ± 2,8	2,9 ± 2,7
Número de embriões D3 de alta qualidade (n)	3,3 ± 2,8	2,9 ± 2,7

Além disso, essas tabelas também incluem informações sobre quaisquer condições médicas preexistentes, condições, uso de medicamentos e fatores de estilo de vida que podem influenciar os resultados do estudo. Essa documentação detalhada permite uma compreensão abrangente do grupo de pacientes e facilita comparações significativas entre os grupos de envelhecimento e envelhecimento/ILIB. Por Incorporando uma gama diversificada de variáveis demográficas e clínicas, este perfil detalhado Permite aos pesquisadores explorar possíveis associações entre esses fatores e a resposta para a terapia ILIB. Além disso, oferece informações valiosas sobre a heterogeneidade da população de pacientes, destacando variações individuais que podem impactar as respostas ao tratamento e resultados.

3.2. O tratamento com ILIB melhorou a oxeiptose de células ovarianas envelhecidas.

A oxeiptose foi recentemente reconhecida como uma forma distinta de morte celular programada. Caracterizado por mecanismos não inflamatórios independentes da atividade da caspase. Este processo envolve a detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da proteína Kelch-like ECH associada. proteína 1 (KEAP1), levando à ativação do fator indutor de apoptose 1 (AIFM1) e A fosfoglicerato mutase 5 (PGAM5) acaba por desencadear uma morte celular semelhante à apoptose. As ROS são normalmente eliminadas rapidamente em condições normais, e seu acúmulo excessivo pode ser prejudicial. Pode induzir diversas vias de morte celular, incluindo apoptose e ferroptose. Fator nuclear O fator 2 relacionado ao eritroide 2 (NRF2) desempenha um papel fundamental na regulação da transcrição de ROS. modulando a expressão de numerosos genes antioxidantes. KEAP1 atua como um sensor para ROS. níveis dentro das células, ajustando a atividade do NRF2 de acordo (Figura 2). Células envelhecidas são particularmente vulneráveis à oxeiptose devido à sua capacidade antioxidante reduzida. Para investigar Para avaliar o impacto do acúmulo de ROS em células envelhecidas, analisamos genes associados à oxeiptose. Nossos resultados revelaram mecanismos de eliminação de ROS comprometidos em células envelhecidas. Seguindo O tratamento com ILIB resultou em um aumento significativo de NRF2 (Figura 2A, 0,041 ± 0,046 vs. 0,20 ± 0,19). Observou-se expressão, sugerindo um aumento nas respostas antioxidantes. No entanto, não houve alterações significativas nos níveis de expressão de KEAP1 e PGAM5. (Figura 2B,C, 0,029 ± 0,03 vs. 0,022 ± 0,031; 0,073 ± 0,06 vs. 0,056 ± 0,06). Notavelmente, O efector a jusante AIFM1, crucial para a regulação da oxeiptose, apresentou uma substancial diminuição na expressão após o tratamento com ILIB (Figura 2D, 0,044 ± 0,035 vs. 0,017 ± 0,01). Isso

células. Após o tratamento com ILIB, observou-se um aumento significativo na expressão de NRF2 (Figura 2A, $0,041 \pm 0,046$ vs. $0,20 \pm 0,19$), sugerindo um aumento nas respostas antioxidantes. No entanto, não houve alterações significativas nos níveis de expressão de KEAP1 e PGAM5 (Figura 2B,C, $0,029 \pm 0,03$ vs. $0,022 \pm 0,031$; $0,073 \pm 0,06$ vs. $0,056 \pm 0,06$). Re-

Notavelmente, o efector a jusante AIFM1, crucial para a regulação da oxeiptose, apresentou uma diminuição substancial na expressão após o tratamento com ILIB (Figura 2D, $0,044 \pm 0,035$ vs. $0,017 \pm 0,01$). Isso indica uma redução significativa na ocorrência de oxeiptose após a intervenção com ILIB.

intervenção, implicando um potencial benefício terapêutico na mitigação dos processos de morte celular mediados por ROS

processos de morte celular em células envelhecidas em células envelhecidas.

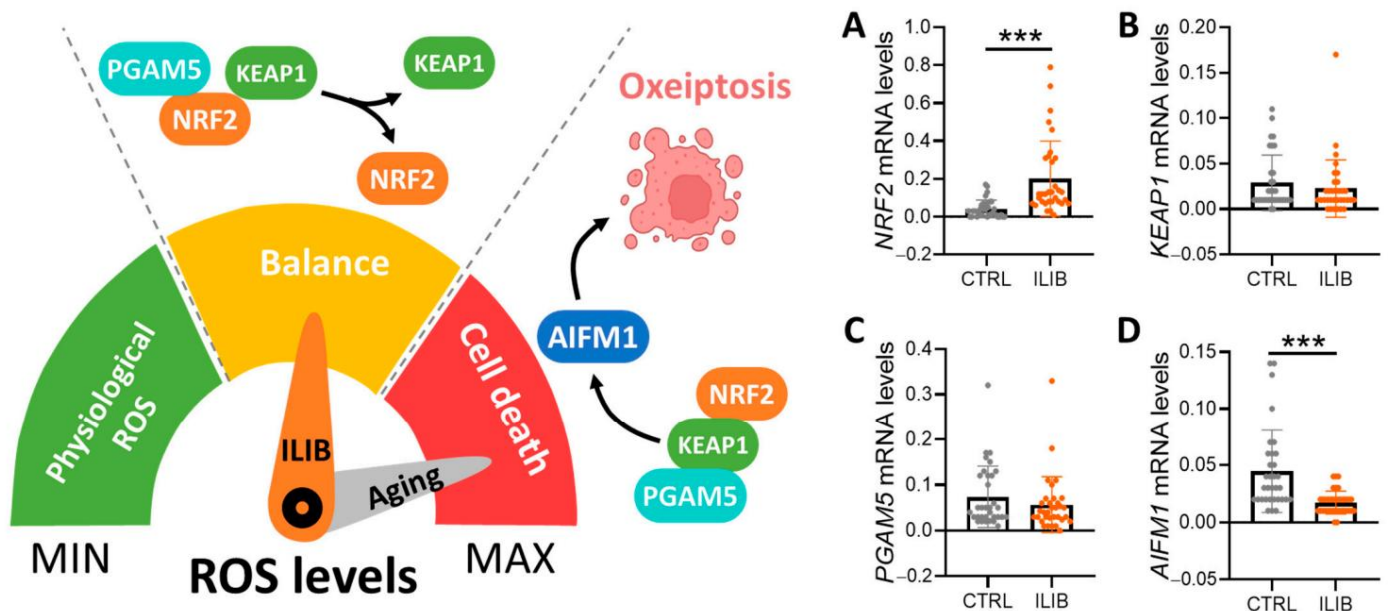


Figura 2. ILIB regula a oxeiptose em células do cumulus humano. Avaliação da expressão de ILIB alterando vias metabólicas e níveis gênicos envolvidos em NRF2 (A), KEAP1 (B), PGAM5 (C) e AIFM1 (D) por análise de qPCR. *** $p < 0,001$.

3.3. O ILIB alterou a reprogramação do metabolismo energético das células do cumulus humano.

3.3. O ILIB alterou a reprogramação do metabolismo energético das células do cumulus humano.

Neste estudo, foram investigadas alterações na reprogramação do metabolismo energético do cúmulo humano em decorrência do tratamento com ILIB. Especificamente, foram analisados os níveis de expressão dos genes.

As células foram avaliadas como resultado do tratamento com ILIB. Especificamente, os níveis de expressão de genes associados à glicólise, como a hexocinase 2 (HK2), lactato desidrogenase A (LDHA), piruvato desidrogenase E1 (PDHA), bem como genes relacionados a

O ciclo do TCA, incluindo CS, SDHA e FH, foi analisado. Notavelmente, o grupo ILIB apresentou

uma diminuição significativa na expressão de HK2 ($0,22 \pm 0,33$ vs. $0,49 \pm 0,70$), enquanto nenhuma alteração notável observou-se na expressão de LDHA, um gene chave envolvido na produção de lactato.

($0,37 \pm 0,24$ vs. $0,28 \pm 0,41$). Por outro lado, a expressão de PDHA, crítica para a conversão de piruvato, em acetil-coenzima A para respiração aeróbica, mostrou um aumento acentuado no ILIB

grupo ($0,050 \pm 0,053$ vs. $0,019 \pm 0,02$) (Figura 3A). Da mesma forma, os níveis de CS, responsáveis por catalisando a síntese de citrato, apresentou um aumento significativo após o tratamento com ILIB ($0,20 \pm 0,16$

vs. $0,10 \pm 0,07$), assim como SDHA ($0,055 \pm 0,049$ vs. $0,021 \pm 0,018$) e FH ($0,082 \pm 0,086$ vs.

$0,039 \pm 0,044$) (Figura 3B). Esses resultados indicam que o ILIB aumentou a energia mitocondrial, eficiência de transporte e aumento da produção de energia em células envelhecidas, destacando seu potencial benefícios terapêuticos na mitigação do declínio da função celular relacionado à idade.

A síntese de citrato, que estava sendo analisada, apresentou um aumento significativo após o tratamento com ILIB ($0,20 \pm 0,16$ vs. $0,10 \pm 0,07$), assim como SDHA ($0,055 \pm 0,049$ vs. $0,021 \pm 0,018$) e FH ($0,082 \pm 0,086$ vs. $0,039 \pm 0,044$) (Figura 3B). Esses resultados indicam que o ILIB aumentou a eficiência do transporte de energia mitocondrial e impulsionou a produção de energia em células envelhecidas, destacando seus potenciais benefícios terapêuticos na mitigação do declínio da função celular relacionado à idade.

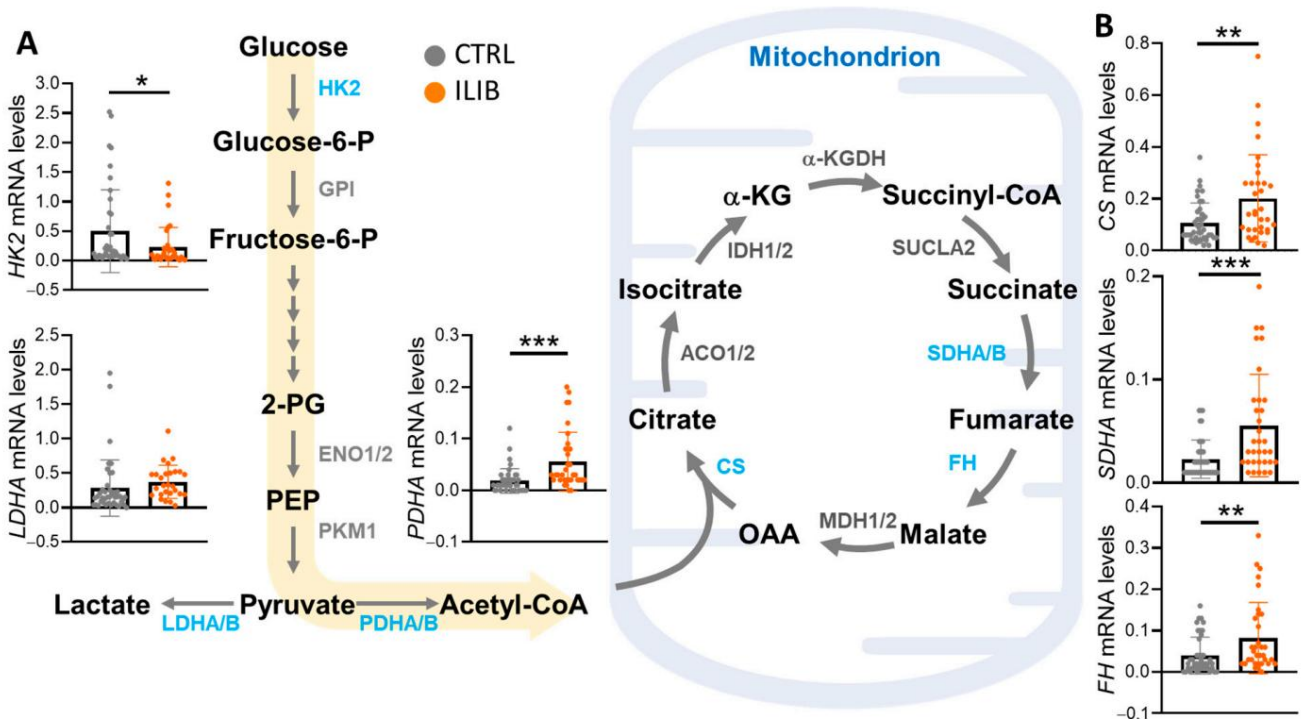


Figura 3. ILIB regula a expressão de genes do metabolismo energético em células de seu envelhecimento. A análise de qPCR da expressão de ILIB alterando vias metabólicas e níveis gênicos envolvidos na glicólise (A) e no ciclo de TCA (B) do TCA (B), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.4. Características Demográficas e Clínicas dos Pacientes antes e após o Tratamento com ILIB

3.4. Características Demográficas e Clínicas dos Pacientes antes e após o Tratamento com ILIB

Examinamos meticulosamente os dados clínicos dos pacientes antes e depois do tratamento com ILIB, permitindo uma avaliação abrangente de seus efeitos. Embora as diferenças do tratamento com ILIB permitiu uma avaliação abrangente dos seus efeitos. Embora a diferença nos níveis de AMH e na contagem de folículos antrais (CFA) antes e depois do tratamento com ILIB não tenham atingido significância estatística, observamos uma tendência notável indicando um aumento nesses parâmetros. Embora não tenha atingido significância estatística, observamos uma tendência notável indicando um aumento nos parâmetros pós-tratamento (Figura 4). Isso sugere um potencial impacto positivo do ILIB em Esses parâmetros após o tratamento (Figura 4) sugerem um potencial impacto positivo na reserva ovariana e no desenvolvimento folicular, embora sejam necessárias mais investigações.

O ILIB demonstrou efeitos significativos na reserva ovariana e na contagem de folículos antrais (CFA) antes e depois do tratamento com ILIB não tenham atingido significância estatística, observamos uma tendência notável indicando um aumento nesses parâmetros. Embora não tenha atingido significância estatística, observamos uma tendência notável indicando um aumento nos parâmetros pós-tratamento (Figura 4). Isso sugere um potencial impacto positivo do ILIB em Esses parâmetros após o tratamento (Figura 4) sugerem um potencial impacto positivo na reserva ovariana e no desenvolvimento folicular, embora sejam necessárias mais investigações.

Uma diferença significativa na relação dos níveis de estradiol e testosterona antes e depois do tratamento revelou uma observou-se um aumento significativo nos níveis basais de LH após o tratamento com ILIB, indicando uma potencial modulação dos perfis hormonais em resposta à terapia. Além disso, embora tenha sido observada uma tendência de alta, isso sugere uma possível influência do ILIB na regulação hormonal dentro do ovário. Apesar da tendência observada após o tratamento com ILIB, a significância estatística não foi alcançada. No entanto, esses achados, em conjunto, sugerem que o tratamento com ILIB pode ter um efeito positivo. Essa tendência sugere uma possível influência do ILIB na regulação hormonal dentro do ovário, com impacto na função ovariana e nos perfis hormonais em pacientes idosas, justificando estudos adicionais. Esses achados, em conjunto, sugerem que o tratamento com ILIB pode ter um impacto positivo na investigação de seus mecanismos e na otimização de sua aplicação clínica para melhorar a saúde.

resultados de fertilidade.

vida em indivíduos com doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico [28].

Investigações anteriores consolidaram o entendimento de que a irradiação sanguínea intravascular a laser (ILIB) possui a capacidade de ativar a cadeia respiratória mitocondrial, aumentando assim a produção de adenosina trifosfato (ATP), vital para a manutenção do metabolismo energético em tecidos envelhecidos [29]. Esse fenômeno ressalta a intrincada interação entre a terapia ILIB e a bioenergética celular, sugerindo um mecanismo potencial pelo qual a ILIB pode exercer seus efeitos terapêuticos. Ao aumentar a síntese de ATP, a ILIB demonstra potencial para revitalizar as funções celulares em tecidos envelhecidos, podendo atenuar o declínio da atividade metabólica e da função tecidual relacionado à idade [27]. Isso destaca a importância de explorar mais a fundo os mecanismos moleculares subjacentes aos aumentos metabólicos induzidos pela ILIB e suas implicações no combate aos processos degenerativos relacionados à idade.

Em nossa investigação, recrutamos 75 pacientes inférteis com ovários envelhecidos e as dividimos em grupos tratados com ILIB e não tratados. O grupo tratado com ILIB foi submetido a dois ciclos de tratamento a laser, enquanto os parâmetros clínicos foram avaliados juntamente com a análise genética das células do cumulus para avaliar alterações na oxeiptose, glicólise e ciclo do TCA. Nossos achados revelaram alterações intrigantes nos padrões de expressão gênica após o tratamento com ILIB. Notavelmente, o ILIB levou a uma regulação positiva significativa dos genes AIFM1 e NRF2, relacionados à oxeiptose, sugerindo um potencial efeito protetor contra a morte celular induzida por estresse oxidativo em ovários envelhecidos. Além disso, o tratamento com ILIB resultou em uma regulação negativa do gene HK2, associado à glicólise, indicando uma mudança do metabolismo anaeróbico para o aeróbico, juntamente com níveis aumentados de PDHA, indicativos de função mitocondrial aprimorada. Consistente com essas alterações, as pacientes tratadas com ILIB exibiram expressão elevada dos principais genes do ciclo do TCA, CS, SDHA e FH, sinalizando melhora no metabolismo e

O potencial do ILIB para impactar positivamente o metabolismo energético e a saúde celular em células germinativas envelhecidas é uma descoberta notável, sugerindo que essa terapia poderia ser integrada a protocolos de tratamento para melhorar os resultados reprodutivos em indivíduos mais velhos. A capacidade do ILIB de modular as vias de estresse oxidativo, aumentar a eficiência mitocondrial e direcionar os processos metabólicos para uma produção de energia mais eficiente reforça seu potencial terapêutico. No entanto, é fundamental compreender os mecanismos subjacentes com mais detalhes, o que poderia abrir caminho para a otimização dos protocolos de tratamento e a maximização dos benefícios terapêuticos. Uma limitação significativa de nossa pesquisa reside no tamanho relativamente pequeno da amostra utilizada. Consequentemente, embora tenhamos observado uma tendência de melhora nos resultados clínicos após o tratamento com ILIB, essas mudanças não atingiram significância estatística. Portanto, é imprescindível interpretar nossos achados com cautela e reconhecer a necessidade de investigações adicionais com coortes maiores para corroborar e validar nossas observações preliminares. Estudos futuros devem buscar incluir um número mais substancial de participantes e considerar delineamentos longitudinais para melhor avaliar os benefícios a longo prazo e os potenciais efeitos colaterais da terapia com ILIB no contexto do envelhecimento e da infertilidade.

Além disso, explorar os impactos diferenciais do ILIB em várias subpopulações, incluindo aquelas com diferentes etiologias de infertilidade, poderia fornecer informações mais personalizadas e aumentar a aplicabilidade do ILIB em contextos clínicos. Compreender as respostas específicas de cada paciente e adaptar os tratamentos de acordo com elas poderia melhorar significativamente os resultados terapêuticos e a satisfação do paciente.

5. Conclusões

Em geral, as diversas vantagens do ILIB ressaltam seu potencial como uma abordagem de tratamento versátil com aplicações mais amplas que vão além do envelhecimento ovariano. Ao combater o estresse oxidativo e impulsionar o metabolismo energético, o ILIB demonstra potencial para melhorar os resultados de saúde em uma variedade de condições médicas. Essa terapia multifacetada tem a capacidade de impactar positivamente diversas condições de saúde, atuando sobre os mecanismos fisiológicos subjacentes.

Contribuições dos autores: Conceitualização, L.-TL e C.-JL; metodologia, C.-UC; análise formal, P.-HL, P.-WL e Y.-CC; recursos, H.-WT; redação – revisão e edição, K.-HT. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MOST 111-2314-B-075B-014-MY3) e pelo Hospital Geral de Veteranos de Kaohsiung (VGHKS113-047, 113-087).

Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa: O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Veteranos de Kaohsiung (código do protocolo VGHKS23-CT3-20 e aprovação em junho de 2023) para estudos envolvendo seres humanos.

Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido: O consentimento livre e esclarecido por escrito foi obtido de cada participante antes de sua inclusão no estudo.

Declaração de disponibilidade de dados: Os dados estão contidos no artigo.

Agradecimentos: Expressamos nossa gratidão a Fan-Yun Huang por fornecer os equipamentos (JC- ILIB-800, Jin-Cheng Medical Company Limited, Taipei, Taiwan) e otimizar as condições de tratamento no presente ensaio clínico.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Comitê de Práticas da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva em colaboração com a Sociedade de Endocrinologia Reprodutiva e Infertilidade. Otimizando a fertilidade natural: Opinião do comitê. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 52–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Broekmans, FJ; Soules, MR; Fauser, BC. Envelhecimento ovariano: mecanismos e consequências clínicas. *Endocr. Rev.* **2009**, *30*, 465–493. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Gruhn, JR; Zielinska, AP; Shukla, V.; Blanshard, R.; Capalbo, A.; Cimadomo, D.; Nikiforov, D.; Chan, AC; Newnham, LJ; Vogel, I.; et al. Erros cromossômicos em óvulos humanos moldam a fertilidade natural ao longo da vida reprodutiva. *Science* **2019**, *365*, 1466–1469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Charalambous, C.; Webster, A.; Schuh, M. Aneuploidia em oócitos de mamíferos e o impacto do envelhecimento materno. *Nat. Rev. Mol. Biol. Celular.* **2023**, *24*, 27–44. [\[CrossRef\]](#)
5. Li, CJ; Lin, LT; Tsai, HW; Chern, CU; Wen, ZH; Wang, PH; Tsui, KH. Regulação molecular na fisiopatologia do envelhecimento ovariano. *Aging Dis.* **2021**, *12*, 934–949. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Secomandi, L.; Borghesan, M.; Velarde, M.; Demaria, M. O papel da senescência celular no envelhecimento reprodutivo feminino e o potencial para intervenções senoterapêuticas. *Hum. Reprod. Update* **2022**, *28*, 172–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Wang, X.; Wang, L.; Xiang, W. Mecanismos de envelhecimento ovariano em mulheres: uma revisão. *J. Ovarian Res.* **2023**, *16*, 67. [\[CrossRef\]](#) 8. Park, SU; Walsh, L.; Berkowitz, KM. Mecanismos do envelhecimento ovariano. *Reproduction* **2021**, *162*, R19–R33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. May-Panloup, P.; Boucrot, L.; Chão de la Barca, JM; Desquiret-Dumas, V.; Ferré-L'Hotellier, V.; Morinière, C.; Descamps, P.; Procácio, V.; Reynier, P. Envelhecimento ovariano: O papel das mitocôndrias em oócitos e folículos. *Zumbir. Reprodução. Atualização* **2016**, *22*, 725–743. [\[CrossRef\]](#)
10. Van Blerkom, J. Função mitocondrial no oócito e embrião humanos e seu papel na competência do desenvolvimento. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 797–813. [\[CrossRef\]](#)
11. Tesarik, J.; Mendoza-Tesarik, R. Mitocôndrias na fertilidade e infertilidade humanas. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8950. [\[CrossRef\]](#)
12. Alberico, HC; Woods, DC. Papel das células da granulosa no envelhecimento ovariano: um foco na função mitocondrial e metabólica. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 800739. [\[CrossRef\]](#)
13. Chiang, JL; Shukla, P.; Pagidas, K.; Ahmed, NS; Karri, S.; Gunn, DD; Hurd, WW; Singh, KK. Mitocôndrias no envelhecimento ovariano. *e Longevidade Reprodutiva. Ageing Res. Rev.* **2020**, *63*, 101168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Stephens, SC; Yarali, H.; Vuong, LN; Carvalho, JF; Uzbek, IY; Polat, M.; Le, HL; Pham, TD; Ho, TM; Humaidan, P.; et al. Taxa cumulativa de nascimentos por ciclo de FIV/ICSI por aspiração em pacientes do programa POSEIDON: um estudo de evidências do mundo real com 9073 pacientes. *Hum. Reprod.* **2021**, *36*, 2157–2169. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Papathanasiou, A.; Mawal, N. O risco de baixa resposta ovariana durante FIV repetida. *Reprod. Biomed. Online* **2021**, *42*, 742–747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Irani, M.; Reichman, D.; Robles, A.; Melnick, A.; Davis, O.; Zaninovic, N.; Xu, K.; Rosenwaks, Z. A classificação morfológica de blastocistos euploides influencia as taxas de implantação e de gravidez em curso. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 664–670. [\[CrossRef\]](#)
17. Reiter, RJ; Sharma, R.; Romero, A.; Manucha, W.; Tan, DX; Zuccari, D.; Chuffa, LGA Falência Ovariana Relacionada ao Envelhecimento e Infertilidade: Melatonina como solução. *Antioxidantes* **2023**, *12*, 695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Yan, F.; Zhao, Q.; Li, Y.; Zheng, Z.; Kong, X.; Shu, C.; Liu, Y.; Shi, Y. O papel do estresse oxidativo no envelhecimento ovariano: uma revisão. *J. Pesquisa Ovariana.* **2022**, *15*, 100. [\[CrossRef\]](#)
19. Kim, YH; Lee, SY; Kim, EY; Kim, KH; Koong, MK; Lee, KA. O antioxidante aurapteno melhora a qualidade dos oócitos envelhecidos. *e Desenvolvimento Embrionário em Camundongos. Antioxidantes* **2022**, *12*, 87. [\[CrossRef\]](#)
20. Fu, JC; Wang, NK; Cheng, YY; Chang, ST. A terapia adjuvante da irradiação a laser intravenosa do sangue (ILIB) na dor e Distúrbios do sono em doenças musculoesqueléticas. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 1333. [\[CrossRef\]](#)

21. Schapochnik, A.; Alonso, PT; de Souza, V.; Rodrigues, V.; Quintela, K.; Cruz, MDP; Ferreira, CM; Cecatto, RB; Rodrigues, M.; Hamblin, MR; et al. Irradiação intravascular a laser do sangue (ILIB) usada para tratar doenças pulmonares: uma breve revisão crítica. *Lasers Med. Sci.* **2023**, *38*, 93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Huang, SF; Tsai, YA; Wu, SB; Wei, YH; Tsai, PY; Chuang, TY. Efeitos da irradiação a laser intravascular do sangue na disfunção mitocondrial e no estresse oxidativo em adultos com lesão medular crônica. *Photomed. Laser Surg.* **2012**, *30*, 579–586. [[CrossRef](#)]
23. Li, CJ; Lin, LT; Tsai, HW; Wen, ZH; Tsui, KH. O membro 5 da família da fosfoglicerato mutase mantém a qualidade do oócito por meio de Reorganização dinâmica mitocondrial durante o envelhecimento. *Aging Cell* **2022**, *21*, e13546. [[CrossRef](#)]
24. Tsui, KH; Li, CJ. A mitoquinona altera o metabolismo energético para reduzir a oxepitose induzida por ROS em células da granulosa feminina e oócitos de camundongos. *Aging* **2023**, *15*, 246–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Su, WP; Li, CJ; Lin, LT; Lin, PH; Wen, ZH; Sheu, JJ; Tsui, KH. Impulsionando a função mitocondrial e o metabolismo no envelhecimento. Células germinativas femininas com dupla inibição de ROCK/ROS. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *163*, 114888. [[CrossRef](#)]
26. Yang, WH; Lin, SP; Chang, ST Relato de caso: Melhora rápida da diátese cerebelar cruzada após laser intravascular Irradiação do sangue em um caso de acidente vascular cerebral. *Medicine* **2017**, *96*, e5646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Tome, RFF; Silva, DFB; Dos Santos, CAO; de Vasconcelos Neves, G.; Rolim, AKA; de Castro Gomes, DQ. ILIB (irradiação intravascular a laser do sangue) como terapia adjuvante no tratamento de pacientes com doenças sistêmicas crônicas - uma revisão integrativa da literatura. *Lasers Med. Sci.* **2020**, *35*, 1899–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Amjadi, A.; Mirmiranpor, H.; Khandani, S.; Sobhani, SO; Shafae, Y. Efeito de irradiação de comprimento de onda de laser intravenoso em Interleucinas: IL-1 γ , IL-1 β , IL6 em ratos diabéticos. *Laser Ther.* **2019**, *28*, 267–273.
29. Momenzadeh, S.; Abbasi, M.; Ebadifar, A.; Aryani, M.; Bayrami, J.; Nematollahi, F. Irradiação sanguínea com laser intravenoso em dor crônica e fibromialgia. *J. Lasers Med. Ciência.* **2015**, *6*, 6–9.

Aviso/Nota do Editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são de exclusiva responsabilidade dos autores e colaboradores individuais, e não da MDPI e/ou dos editores. A MDPI e/ou os editores se eximem de qualquer responsabilidade por danos a pessoas ou bens decorrentes de ideias, métodos, instruções ou produtos mencionados no conteúdo.