AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**LUZ DE BAIXA POTÊNCIA COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA
À SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO ANIMAL**

Tania Mateus Yoshimura

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2014**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**LUZ DE BAIXA POTÊNCIA COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA
À SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO ANIMAL**

Tania Mateus Yoshimura

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2014

Inspirai, ó Senhor, as nossas ações, e ajudai-nos a realizá-las, para que em Vós comece e para Vós termine tudo aquilo que fizermos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, queridos e amados, pela imensa paciência! Cheguei até aqui pela força e pelo apoio de vocês. ...Eu sei que minha educação exigiu vários sacrifícios, e esse trabalho é uma pequena forma de agradecer tudo que investiram em mim. Desejo sinceramente que bons frutos ainda venham de toda a dedicação que foi necessária para a minha formação.

À professora Martha, por ter aberto as portas para o meu ingresso na pós-graduação. Agradeço pela confiança, por todo apoio com que pude contar, e por cada puxão de orelha que levei durante esses anos. Marthinis, desculpa qualquer coisa!

Aos meus colegas de laboratório: Antonio, Dom Garcez, Drale, Camila, China, Caetano, Débora, Ilka, Renatinho, Silvinha, Sassá, agradeço imensamente pelas contribuições e pelo carinho com que fui recebida. Parte de todos vocês está aqui, nessa dissertação. Espero ter correspondido às expectativas! Muitos se tornaram mais do que colegas, e tenho certeza que permanecerão na minha vida por muito tempo (vocês vão ter que me aguentar!).

Não posso deixar de agradecer também aos meninos do CQMA, pela companhia nas disciplinas obrigatórias, e pelo exemplo de foco e determinação. Vocês vão longe, que eu sei.

Aos colegas do CLA, Carolzinha, Letícia, Cacau, Cássio, Luquete, meus agradecimentos pela companhia nesses dois anos de trabalho.

Às minhas amigas da faculdade, por permanecerem do meu lado, e me encorajarem nos momentos cruciais.

À família Kazurayama Lipp, por ter me adotado em momentos delicados, renovando minhas forças sempre quando precisei. Um agradecimento especial ao Marcel e à Naná, que me arrancam sorrisos, mesmo à distância.

Aos pesquisadores do Centro de Lasers e Aplicações (CLA), pelos momentos de convivência, pelos *happy-hours*, pelo aprendizado.

Ao Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela infraestrutura, e aos funcionários por todo apoio. Esse trabalho não teria acontecido sem a contribuição de cada um de vocês. Não posso deixar de mencionar a Neide, e agradecê-la pelo auxílio durante as experimentações.

Aos funcionários do CLA, agradeço por estarem sempre prontos a ajudar. Os sorrisos, a acolhida, fizeram do meu tempo aqui mais feliz.

Um TKS especial ao QTH do CLA, agente Rosa. Aprendi muito com o senhor, QSL?

Ao IPEN, agradeço pela infraestrutura que permitiu a realização desse trabalho.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, agradeço o auxílio financeiro.

LUZ DE BAIXA POTÊNCIA COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA À SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO ANIMAL

Tania Mateus Yoshimura

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é uma condição clínica que agrupa uma variedade de morbidades, como hiperglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica e obesidade (particularmente na região abdominal). Nessa conjuntura, os principais tecidos-alvo da ação da insulina sofrem alterações metabólicas que aumentam o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. As alterações teciduais observadas são caracterizadas por infiltrados de células do sistema imune, especialmente macrófagos. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , são liberadas e alcançam a corrente sanguínea, promovendo nesses indivíduos um estado de inflamação crônica e sistêmica. O tecido adiposo intra-abdominal parece ser de particular importância no estabelecimento desse quadro inflamatório, e estratégias direcionadas no sentido de modular os processos inflamatórios nesse tecido podem atenuar as consequências da SM. Os reconhecidos benefícios da terapia com luz de baixa potência em condições inflamatórias nos permitem supor que essa poderia ser uma proposta terapêutica para a SM. Sendo esse o nosso foco de estudo, camundongos adultos, machos, das linhagens C57BL/6 e BALB/c receberam dieta hiperlipídica durante 8 semanas para indução do quadro de SM. Os animais foram então irradiados sobre a superfície abdominal no decorrer de 21 dias, usando um LED ($\lambda = 850$ nm, 6 sessões, 300 s por sessão, potência = 60 mW, fluência = 6 J/cm², taxa de fluência = 19 mW/cm²). Antes e durante o tratamento, amostras de sangue foram coletadas para quantificação de glicose, colesterol total e triglicérides plasmáticos. Considerando os parâmetros de irradiação adotados, a terapia com luz de baixa potência não se mostrou efetiva para alterar massa corporal, glicemia, colesterol total e triglicérides de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

LOW LEVEL LIGHT THERAPY AS A THERAPEUTIC PROPOSAL FOR MICE WITH METABOLIC SYNDROME

Tania Mateus Yoshimura

ABSTRACT

Metabolic syndrome comprises a constellation of morbidities such as insulin resistance, hyperinsulinemia, atherogenic dyslipidemia, dysglycemia and obesity (especially abdominal). Metabolic alterations are observed in major insulin target organs, increasing the risk of cardiovascular diseases, type-2 diabetes and therefore mortality. Tissue alterations are characterized by immune cells infiltrates (especially activated macrophages). Released inflammatory mediators such as TNF- α induce chronic inflammation in subjects with metabolic syndrome, since inflammatory pathways are activated in the neighboring cells. The intra-abdominal adipose tissue appears to be of particular importance in the onset of the inflammatory state, and strategies contributing to modulate the inflammatory process within this adipose tissue can mitigate the metabolic syndrome consequences. Considering the low level light therapy (LLLT) recognized benefits in inflammatory conditions, we hypothesized this therapeutic approach could promote positive effects in modulating the inflammatory state of metabolic syndrome. That being the scope of this study, male C57BL/6 AND BALB/c mice were submitted to a high-fat/high-fructose diet among 8 weeks to induce metabolic syndrome. Animals were then irradiated on the abdominal region during 21 days using an 850 nm LED (6 sessions, 300 seconds per session, 60 mW output power, ~ 6 J/cm² fluence, ~ 19 mW/cm² fluence rate). Before and during treatment, blood was sampled either from the retro-orbital plexus or from tail puncture for glucose, total cholesterol and triglycerides analysis. Our results indicate no alterations on these metabolic parameters after LLLT.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	12
2.1. Gerais	12
2.2. Específicos	12
2.3. Observações	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1. Síndrome metabólica: definição	13
3.2. Modelos animais de síndrome metabólica: roedores	13
3.3. Tecido adiposo: órgão endócrino	15
3.4. Tecido adiposo, inflamação e síndrome metabólica	18
3.5. Fototerapia no tratamento de desordens inflamatórias	24
4. FASE I: MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Modelo animal de síndrome metabólica	27
4.2. Acompanhamento dos parâmetros metabólicos	29
4.3. Tomografia por coerência óptica	29
4.4. Análise estatística	31
5. FASE I: RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. FASE I: CONCLUSÕES	36
7. FASE II: MATERIAIS E MÉTODOS	37
7.1. Modelo animal de síndrome metabólica	37
7.2. Terapia com luz de baixa potência	38
7.3. Avaliação dos parâmetros metabólicos	40

7.4. Análise estatística	41
8. FASEII: RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
8.1. Indução da síndrome metabólica	42
8.1.1. Camundongos C57BL/6.....	42
8.1.2. Camundongos BALB/c.....	43
8.2. Terapia com luz de baixa potência	45
9. FASE II: CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	59
ANEXO 2: ARTIGO PUBLICADO (PROCEEDINGS SPIE WEST 2014).....	60

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: critérios diagnósticos para síndrome metabólica	13
Tabela 2: principais moléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo, e seus efeitos metabólicos relacionados à obesidade	16
Tabela 3: diferenças encontradas na proporção de células do sistema imune residentes do tecido adiposo branco de camundongos magros e obesos	19
Tabela 4: informação nutricional da ração padrão Nuvilab CR-1	28
Tabela 5: informação nutricional e composição da dieta modificada	28
Tabela 6: proporção de ganho em relação à massa inicial dos animais	32
Tabela 7: especificações do LED e parâmetros de irradiação	39
Tabela 8: parâmetros metabólicos após as primeiras oito semanas de dieta hipercalórica de camundongos C57BL/6, em comparação aos seus valores iniciais	43
Tabela 9: parâmetros metabólicos após as primeiras oito semanas de dieta hipercalórica (BALB/c), em comparação aos seus valores iniciais	44
Tabela 10: comparação da massa corporal de camundongos das linhagens BLB/c e C57BL/6 antes do início (semana 8) e depois das irradiações (semana 11)	48

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: mortes por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ocorridas no ano de 2008	8
Figura 2: à direita da imagem, animal com mutação no gene <i>ob</i> , em relação a camundongo normal.....	17
Figura 3: esquema ilustrando as atividades pró e anti-inflamatórias do tecido adiposo branco	20
Figura 4: ilustração da interferência da resposta inflamatória intracelular na sinalização da insulina, pela ativação de TLR.....	23
Figura 5: espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico, mostrando a “janela terapêutica”	26
Figura 6: profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda.....	26
Figura 7: diagrama esquemático do sistema de OCT.....	30
Figura 8: progressão da massa corporal de camundongos BALB/c no decorrer de 20 semanas.....	32
Figura 9: valores médios de glicemia de camundongos BALB/c, no decorrer de 20 semanas.....	33
Figura 10: imagens obtidas através de tomografia por coerência óptica de seções transversais da região abdominal de camundongos BALB/c com 22 semanas de vida	34
Figura 11: camundongos BALB/c durante necropsia	35
Figura 12: delineamento experimental detalhado.	37
Figura 13: foto de um camundongo da linhagem C57BL/6 durante uma sessão de irradiação.....	39
Figura 14: espectro de emissão do LED.....	40

Figura 15: comparação dos parâmetros metabólicos de camundongos C57BL/6 antes e depois do período de indução da síndrome metabólica	43
Figura 16: comparação dos parâmetros metabólicos de camundongos BALB/c antes e depois do período de indução da síndrome metabólica	45
Figura 17: evolução dos parâmetros metabólicos de camundongos C57BL/6 dos grupos (C) e (LED) durante período de tratamento com luz de baixa potência	46
Figura 18: evolução dos parâmetros metabólicos de camundongos BALB/c dos grupos (C) e (LED) durante período de tratamento com luz de baixa potência	47
Figura 19: comparação entre os grupos irradiado (LED) e não irradiado (C) em relação aos parâmetros metabólicos avaliados	50

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) [1], das 57 milhões de mortes ocorridas em 2008, 63 % (36 milhões) foram em decorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente diabetes mellitus (DM), doenças cardiovasculares (DCV), cânceres e doenças respiratórias crônicas (Figura 1).

Figura 1: mortes por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ocorridas no ano de 2008. Adaptado de World Health Organization, 2011 [1].

Apesar de poderem ser prevenidos em 80 % dos casos [2], DM e DCV contribuem para praticamente metade dessas mortes, arrastando consigo o peso socioeconômico de envolver, além da mortalidade e dos gastos no tratamento, a diminuição da qualidade de vida e da produtividade. Em 2005, o Brasil teve perdas de USD 2,7 bilhões na renda nacional por conta dessas doenças, um prejuízo que pode triplicar em 2015, de acordo com projeções da própria OMS [3].

Os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) se agrupam em uma condição conhecida como síndrome metabólica (SM). Hiperglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica e obesidade (particularmente na região abdominal) são fortes preditores para o seu

desenvolvimento e progressão. Ainda não é possível determinar o que é causa ou consequência da SM, mas há consenso entre diversas sociedades especialistas de que resistência à ação da insulina e adiposidade central são denominadores comuns entre indivíduos com síndrome metabólica [4, 5]. De alguma forma, essas duas condições contribuem para alterações metabólicas que levam ao DM2 e às DCV.

O tecido adiposo abdominal é destacado como importante componente da SM por apresentar características inflamatórias nos indivíduos obesos. Hotamisligil e colaboradores [6] foram os primeiros a verificar expressão aumentada de TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor alpha*) nesse tecido adiposo, mostrando que, aquilo que eles já haviam constatado em modelos murinos de obesidade [7, 8, 9], também ocorria nos seres humanos. De 1995 para cá, o corpo de estudos construído retrata o tecido adiposo branco dos obesos como um órgão ricamente permeado por células do sistema imune, e que apresenta níveis aumentados de outras citocinas além do TNF- α , como interleucinas ((IL)-1 β , IL-6) e proteínas quimiotáticas (CCL2, do inglês *chemokine (C-C motif) ligand 2*, por exemplo) [10, 11, 12, 13, 14].

O estado inflamatório do tecido adiposo está intimamente ligado ao desenvolvimento de resistência à insulina, pois a ativação de vias mediadas por receptores *Toll-like* (TLR) leva à inibição intracelular da sinalização da insulina [10, 11]. Dessa forma, tecidos que dependem da insulina para captação de glicose têm seu metabolismo alterado, o que pode levar a um estado de hiperglicemia.

Pensando nisso, alguns estudos farmacológicos vêm sendo conduzidos com o intuito de resolver a inflamação inerente ao quadro da SM através do bloqueio de vias inflamatórias (tanto locais como sistêmicas). Larsen e colaboradores [15], por exemplo, administraram a pacientes diabéticos um medicamento tipicamente utilizado no tratamento da artrite reumatoide, que tem como mecanismo de ação o bloqueio do receptor para IL-1. Após 13 semanas, foi observada melhora no metabolismo da glicose, com redução nos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios (proteína c-reativa (PCR) e IL-6). Yuan [16] e Goldfine [17], juntamente com seus colaboradores, também relataram o restabelecimento da tolerância à glicose com a utilização de salicilatos ou

salsalatos, em roedores e seres humanos, respectivamente, por meio da inibição da via do NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

Diversos autores têm, portanto, destacado a importância de inibir tais vias inflamatórias na abordagem terapêutica da SM, considerando promissoras pesquisas que se desenvolvam no sentido de modular a inflamação observada nessa condição, mas que não levem ao prejuízo da resposta imune dos pacientes [10, 11, 18]. A própria OMS, em sua última estratégia global para prevenção e controle de DCNT [19], enfatiza a necessidade de promover e apoiar investigações multissetoriais e multidimensionais que gerem ou fortaleçam estratégias de prevenção e controle dessas doenças.

Nesse sentido, a nossa proposta visa um tratamento não invasivo e sem efeitos colaterais, com o objetivo de reduzir a inflamação característica da SM, por meio da terapia com luz de baixa potência (LLLT, do inglês *Low Level Light Therapy*).

De acordo com Chung e colaboradores [20], o uso da fototerapia nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho próximo pode ser dividido em três grandes áreas: 1) redução da inflamação e edema em doenças articulares (crônicas ou agudas); 2) estímulo da cicatrização e reparação tecidual em diversos tecidos; e 3) tratamento de dores e doenças neurológicas.

Como alguns exemplos em modelos murinos, foram observados redução do edema, infiltrado inflamatório e expressão de citocinas pró-inflamatórias em distúrbios articulares [21, 22, 23, 24]; melhora de função renal, redução da pressão arterial e expressão de IL-6 e CCL2 em modelos de doença renal [25, 26]; diminuição da fibrose em lesões musculares de ratos diabéticos [27] e melhora da dor, redução de macrófagos, TNF- α e IL-1 β após indução de dor neuropática [28]. Estudos *in vitro* reforçam a capacidade imunomodulatória da LLLT ao demonstrar, em linhagens murinas de monócitos/macrófagos, menor síntese e expressão de CCL2, IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-10 e TNF- α quando da estimulação por fatores pró-inflamatórios (lipopolissacarídeo ou interferon- γ (IFN- γ)) [29, 30]. Com relação ao tecido adiposo [31], as atenções estão mais voltadas à estética, sendo apresentados relatos de redução de gordura localizada [32, 33] e diminuição no tamanho associada ao extravasamento do conteúdo lipídico de adipócitos retirados em lipectomia após irradiação com laser [34].

Atualmente, não existem trabalhos na literatura com uso da LLLT voltados ao tratamento da SM, que tem se mostrado uma condição persistente de inflamação tanto crônica como sistêmica. O estudo de Uceró e colaboradores [25] é o único a abordar a fototerapia em um modelo animal de SM (ratos ZSF1), mas utiliza a LLLT para o tratamento da doença renal crônica comum a essa síndrome. Outra pesquisa interessante, focada em uma situação de inflamação crônica, foi conduzida por Höfling e colaboradores [35], e apresentou como resultado do tratamento com LLLT a melhora da função tireoidiana de pacientes com tireoidite crônica autoimune, num seguimento de nove meses após as irradiações. Os trabalhos com LLLT em inflamações crônicas localizadas, no entanto, costumam se restringir a um período curto de acompanhamento, em situações clínicas que muitas vezes se resolvem quando são cessados os estímulos inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Tendo em vista a lacuna existente na literatura, nosso trabalho busca uma alternativa terapêutica que utiliza a LLLT no quadro da SM, em um modelo murino.

2.2. Específicos

Avaliar os efeitos da LLLT sobre parâmetros metabólicos (glicemia, colesterolemia, trigliceridemia e massa corporal) de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 com SM induzida por dieta hiperlipídica.

2.3. Observações

Para alcançar os objetivos propostos, nosso trabalho foi dividido em duas etapas. Na **Fase I**, o intuito foi estabelecer o modelo de SM em linhagem murina, e na **Fase II** estudamos os efeitos da fototerapia propriamente dita. A metodologia empregada em cada fase, e os resultados obtidos, portanto, serão apresentados separadamente.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Síndrome metabólica: definição

A SM é uma condição clínica que agrupa uma variedade de morbidades, como hiperglicemia, pressão arterial elevada, dislipidemia aterogênica e obesidade (particularmente na região abdominal), podendo ser compreendida como a associação dos principais fatores de risco para ocorrência de DCV e DM2. Sua proposição data de 1988, quando Reaven chamou a atenção para a frequência com que esses fatores de risco se apresentavam em um mesmo paciente [36]. Desde então, muitas foram as formas de classificar essa síndrome, e, atualmente, diversas sociedades de especialistas propuseram como critérios de diagnóstico a presença simultânea de três dos seguintes critérios [4, 5]:

Tabela 1: critérios diagnósticos para síndrome metabólica

Crítérios	Pontos de corte
Circunferência abdominal aumentada	De acordo com definições específicas para cada país ou grupo étnico
Hipertrigliceridemia ¹	≥150 mg/dL (1,7 mmol/L)
HDL-colesterol baixo ^{1,2}	
Homens:	<40 mg/dL (1,0 mmol/L)
Mulheres:	<50 mg/dL (1,3mmol/L)
Pressão arterial aumentada ¹	
Sistólica:	≥ 130 mmHg e/ou
Diastólica:	≥ 85 mmHg
Hiperglicemia de jejum ¹	≥ 100 mg/dL

¹Ou em uso de medicação para normalização. ²HDL, do inglês *high density lipoprotein*.

Adaptado de Alberti et al [4] e Grundy et al [5].

3.2. Modelos animais de síndrome metabólica: roedores

Difícilmente um modelo animal será capaz de mimetizar todos os componentes da SM. Por essa razão, Kennedy e colaboradores [37] sugerem que a SM, em roedores, seja definida quando dislipidemia *ou* hipertensão arterial *ou* hiperglicemia ocorrem na presença da obesidade. Sendo assim, ao invés de três critérios simultâneos, somente dois seriam necessários para um modelo satisfatório. Os principais modelos

utilizados na atualidade são animais com alguma predisposição genética para o desenvolvimento de obesidade, diabetes ou dislipidemia, além daqueles obtidos por indução através de modificações dietéticas.

Dois modelos bastante conhecidos são os camundongos deficientes em leptina ($Lep^{ob/ob}$) ou com alterações no receptor da leptina ($LepR^{db/db}$) [37, 38]. A leptina é um hormônio anorexígeno produzido pelo tecido adiposo que interfere diretamente no comportamento alimentar: quanto maior a proporção de gordura corporal, maiores os níveis de leptina circulante, e maior é a saciedade induzida por ela através do sistema nervoso central. Indivíduos obesos, no entanto, apresentam resistência à ação desse hormônio, não respondendo adequadamente ao seu estímulo anorexígeno e mantendo alta ingestão alimentar [39]. Por conta disso, os dois modelos acima citados são largamente utilizados, uma vez que esses camundongos apresentam um grau severo de obesidade, comumente associada com resistência à insulina. De perfil metabólico semelhante, camundongos Agouti que expressam o gene letal *yellow* (A^Y/a) produzem uma proteína que compete com o hormônio anorexígeno MSH (do inglês *melanocyte stimulating hormone*) pela ligação ao receptor 4 de melanocortina (MC4-R, do inglês *melanocortin 4 receptor*), o que gera um comportamento hiperfágico nesses animais [37, 38]. Esses modelos, entretanto, falham em promover hiperlipidemia e hipertensão arterial, além de trazerem consigo outras alterações metabólicas (interferência no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos animais $Lep^{ob/ob}$ e $LepR^{db/db}$, e morte prematura e predisposição a tumores no caso dos A^Y/a).

Quando o foco do estudo envolve aterosclerose ou dislipidemia, os modelos selecionados são principalmente os camundongos deficientes em receptor de LDL ($LDLR^{-/-}$, do inglês *low-density lipoprotein*) ou em apolipoproteína E ($apoE^{-/-}$). Em condições dietéticas controladas (altamente hiperlipídicas, ou enriquecidas com colesterol), esses animais desenvolvem uma exacerbada dislipidemia, levando à formação espontânea de placas de ateroma. Ainda é possível realizar o cruzamento desses camundongos com os $Lep^{ob/ob}$, $LepR^{db/db}$ ou A^Y/a , gerando animais cujos fenótipos se aproximam mais da SM observada em humanos [37].

A grande crítica a esses modelos, no entanto, repousa sobre o grau em que o determinismo genético levaria ao desenvolvimento da obesidade e de suas morbidades associadas. Atualmente, a obesidade é considerada uma desordem poligênica – abrangendo a participação de inúmeros genes envolvidos na regulação do comportamento alimentar, metabolismo e balanço energéticos – que também está fortemente sujeita à influência de fatores ambientais [40, 41]. Nesse contexto, a escolha de um modelo animal geneticamente modificado se torna um desafio. Quando o escopo do estudo se sustenta na observação de um mecanismo específico da SM, é possível fazer essa opção, inclusive para limitar a interferência de outras variáveis. No nosso caso, porém, o objetivo nos permitiu utilizar outra metodologia, a partir da indução da obesidade por modificações dietéticas.

Camundongos C57BL/6 são conhecidos por manifestar espontaneamente obesidade de início tardio, ou seja, mesmo que sejam alimentados com ração padrão, os animais desenvolvem obesidade gradualmente no decorrer de sua vida adulta [38]. De uma maneira muito semelhante ao que acontece nos seres humanos com SM, tais roedores apresentam hiperglicemia, com sinais de resistência à leptina e à insulina [38, 42]. Quando recebem uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, a velocidade do ganho de massa corporal aumenta consideravelmente [43, 44]. Esse ganho de massa é acompanhado de uma deposição significativa de gordura no compartimento intra-abdominal [45, 46], e o tecido adiposo visceral apresenta características marcadamente inflamatórias [11, 18, 47]. Diversos autores consideram que uma dieta hiperlipídica, onde lipídios forneçam pelo menos 40 % das calorias, administrada durante pelo menos oito semanas, é adequada para indução de obesidade e resistência à insulina em camundongos [43, 48, 49, 50].

3.3. Tecido adiposo: órgão endócrino

Até recentemente, o tecido adiposo branco (TAB) era conhecido simplesmente como um reservatório de energia armazenada na forma de triacilgliceróis, que também teria funções de isolamento térmico e proteção mecânica para as vísceras. A partir do final da década de 1980, no entanto, descobertas a respeito de sua capacidade

secretória elevaram o TAB a um importante protagonista do metabolismo, com efeitos biológicos promovidos em órgãos como o fígado, músculo esquelético e cérebro [51]. Atualmente, portanto, o tecido adiposo é reconhecido como um exímio regulador de processos metabólicos e fisiológicos, influenciando, por exemplo, a sensibilidade à insulina, a neoglicogênese, o metabolismo lipídico e a hemodinâmica [52]. As moléculas secretadas pelo tecido adiposo são denominadas “adipocinas”, e suas principais funções se encontram descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2: principais moléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo, e seus efeitos metabólicos relacionados à obesidade.

Adipocina	Principais efeitos metabólicos
Leptina	↓ apetite (por ação no hipotálamo); ↑ gasto energético (por ação central)
Adiponectina	Propriedades anti-inflamatórias; ↑ sensibilidade à insulina; ↑ gasto energético (por ação central)
TNF-α, IL-6 e IL-1β	Citocinas pró-inflamatórias; ↓ sensibilidade à insulina; IL-1 β : parece estar associada com apoptose de células β pancreáticas
CCL2	Molécula quimiotática, contribui para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo
VEGF	↑ angiogênese no tecido adiposo

Adaptado de Blüher, 2014 [52].

A leptina foi identificada em 1994 pelo grupo de Zhang [53], mas seu papel sobre a regulação da massa corporal já era vislumbrado desde 1950, quando uma mutação genética espontânea em camundongos foi descrita [54]. Aos animais homozigotos, o gene, à época denominado *ob*, e hoje reconhecido por codificar a leptina, confere um fenótipo de obesidade severa aos animais. Aos dez meses de vida, camundongos com tal mutação chegaram a pesar 90 g, uma massa três vezes maior quando comparada à de seus companheiros de ninhada (**Figura 2**). Após a necropsia, foi percebido que o aumento de massa era devido quase que exclusivamente ao aumento da adiposidade corporal. Dezesseis anos mais tarde, Hummel e colaboradores [55],

observaram a consequência de outra mutação genética em animais semelhantes aos “*ob/ob*”, que apresentavam, além da obesidade, um diabetes bastante expressivo. Essas características também se manifestavam em animais homozigotos, e foi sugerido denominar essa nova linhagem como *db/db*.

Figura 2: à direita da imagem, animal com mutação no gene *ob*, em relação a camundongo normal.

Retirado de Ingalls *et al*, 1950 [54].

Entre as décadas de 1950 e 1980, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de elucidar os mecanismos que levavam à obesidade nos animais que apresentavam tais mutações. Usando a técnica de parabiose, onde a circulação sanguínea de um par de animais é cirurgicamente compartilhada através de anastomoses, pesquisadores concluíram que algum fator circulante estaria relacionado diretamente com a saciedade. A velocidade de ganho de massa dos animais *ob/ob* unidos a animais normais voltava à normalidade, enquanto que animais normais em parabiose com *db/db* morriam por inanição, ainda que os *db/db* continuassem obesos. Animais com lesões cerebrais também foram incluídos nesses estudos, revelando que o tal fator circulante tinha ação sacietógena mediada pelos centros hipotalâmicos. Desde então, sabemos que os animais *ob/ob* não são capazes de produzir esse fator em quantidades suficientes para

manifestação de seus efeitos, enquanto que os *db/db* sintetizavam-no em quantidades suprafisiológicas, mas, por algum mecanismo à época desconhecido, não respondiam a esses estímulos [56, 57, 58].

Foi somente na década de 1990, com os ensaios de clonagem posicional [53], que esse fator foi identificado, e hoje sabemos do papel da leptina nos centros de saciedade de camundongos e humanos. Desde então foram verificadas outras ações dessa adipocina, interferindo no metabolismo hematopoiético, angiogênico, reprodutivo, ósseo, lipídico, glicêmico e imunitário [59, 60]. Células do sistema imune, como monócitos, macrófagos e linfócitos, possuem receptores para a leptina, e sua ativação leva ao aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN- γ), e aumenta a resposta inflamatória em células previamente sensibilizadas [59, 61, 62].

Além da leptina, outras substâncias produzidas pelo tecido adiposo contribuem fortemente para o estabelecimento do estado pró-inflamatório, comumente observado na SM. Destacados na **Tabela 2**, temos TNF- α , IL-6, IL-1 β e CCL2, e seus efeitos na SM serão abordados na seção abaixo.

3.4. Tecido adiposo, inflamação e síndrome metabólica

O tecido adiposo branco é naturalmente habitado por células do sistema imune. Na obesidade, a composição dessas células muda significativamente, como ilustrado na **Tabela 3**. Há um aumento importante de macrófagos e linfócitos T CD8⁺/CD4⁺, e diminuição de células T regulatórias. Com o auxílio da **Figura 3**, percebemos que as células que têm sua proporção aumentada na obesidade são justamente aquelas que direcionam o metabolismo do TAB para um perfil pró-inflamatório, enquanto que as células com características imunomodulatórias estão diminuídas [10, 11, 18].

Tabela 3: diferenças encontradas na proporção de células do sistema imune residentes do tecido adiposo branco de camundongos magros e obesos.

Tipos celulares	Camundongos	
	Magros	Obesos
Macrófagos	46 %	55 % ↑
Eosinófilos	7 %	1 % ↓
Treg	3 %	1 % ↓
NKT	2 %	1 % ↓
MDSC	2 %	5 % ↑
NK	10 %	6 % ↓
Outros	11 %	8 % ↓
Linfócitos B	8 %	11 % ↑
Linfócitos T CD8 ⁺	3 %	5 % ↑
Linfócitos T CD4 ⁺	8 %	7 % ↑

Treg = células T regulatórias, NKT = células T *natural killers*, MDSC = do inglês *myeloid-derived suppressor cell*, NK = células *natural killers*. As setas indicam aumento (↑) ou diminuição (↓) em relação ao TAB de camundongos magros.

Adaptado de Sun *et al* [18]

Figura 3: esquema ilustrando as atividades pró e anti-inflamatórias do tecido adiposo branco. M1: macrófagos classicamente ativados; M2: macrófagos alternativamente ativados. Adaptado de Sun *et al* [18].

Olefsky & Glass [11] destacam que, em camundongos e seres humanos obesos, os macrófagos podem representar mais de 40 % do conteúdo total de células do TAB. Tal quantidade chega a ser surpreendente, e é de se imaginar que, de alguma forma, essa população aumentada de macrófagos interfira no metabolismo do TAB. Um fato interessante é que os macrófagos tanto podem exibir atividade pró como anti-inflamatória, dependendo dos estímulos a que são submetidos. Em resposta a IFN- γ , TNF- α e LPS (lipopolissacarídeos, um componente de membrana de bactérias Gram-negativas), essas células são polarizadas para uma resposta inflamatória clássica do tipo 1, consequentemente produzindo citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico) e causando dano tecidual. Alternativamente, os macrófagos podem ser ativados por IL-4 e IL-3 para uma resposta inflamatória do tipo 2, no sentido de resolver a inflamação e possibilitar o reparo tecidual através da secreção de IL-10, que, por sua vez, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Na condição de obesidade, o balanço entre macrófagos M1 $\leftrightarrow$ M2 (classicamente $\leftrightarrow$ alternativamente ativados,

respectivamente) do TAB está alterado, pendendo para o lado esquerdo da equação [10, 11, 18].

Mas qual gatilho dispararia a inflamação no TAB, na condição de obesidade? Essa pergunta continua sem resposta, mas algumas possibilidades foram levantadas no sentido de elucidá-la. Em 1993, o grupo de Hotamisligil detectou uma expressão bastante aumentada de TNF- α no TAB de roedores obesos, quando comparada a de seus pares eutróficos [7]. Nesse mesmo trabalho, os autores identificaram os adipócitos como as células que mais contribuíam para essa produção exacerbada. Àquela época, efeitos inibitórios do TNF- α sobre a resposta insulínica já haviam sido observados tanto *in vitro* como *in vivo*, posicionando-o como um importante elo entre obesidade, inflamação e resistência à insulina [7]. Dois anos mais tarde, dando continuidade às suas investigações, Hotamisligil e seus colaboradores trouxeram à luz que o TAB de seres humanos obesos também apresentava expressão e níveis significativamente aumentados de TNF- α , níveis esses que se correlacionaram positivamente com a insulinemia de jejum [6]. Uma das hipóteses para explicar esse aumento de TNF- α seria uma resposta ao estiramento mecânico provocado pela hipertrofia do adipócito, sinalizando o excesso de lipídios armazenados em seu interior, para reduzir a captação de ácidos graxos e glicose em resposta à insulina [9]. Com forte estímulo inflamatório, essa citocina secretada pelos adipócitos favorece a polarização dos macrófagos circunvizinhos para um perfil M1, amplificando a atividade pró-inflamatória no TAB.

Outra via que induz a ativação clássica de macrófagos é mediada por TLR (do inglês *toll-like receptor*) [10, 11, 18]. Esses receptores *toll-like* são abundantemente encontrados na membrana de células do sistema imune, e têm como função o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos [63]. Dentre as onze formas de TLR identificadas em mamíferos, o TLR4 parece ser de grande importância na patogênese da SM. Sua função está classicamente relacionada à resposta imune inata, pois de sua ativação em macrófagos decorrem a transcrição e liberação de citocinas pró-inflamatórias [63, 64, 65, 66, 67]. Resumidamente, a ativação do TLR4 por seus ligantes favorece a ativação do complexo enzimático IKK (do inglês *inhibitor of kappa-B kinase*), que, por sua vez, promove fosforilação do I κ B (do inglês *inhibitor of kappa-B*). Uma vez

fosforilado, o I κ B sofre dissociação do NF κ B (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que é translocado para o núcleo celular, onde estimula a transcrição de genes relacionados a citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e CCL2 [64].

A ativação do TLR4 também promove a fosforilação da enzima JNK (do inglês *c-jun N-terminal kinase*), que adquire função de serina-quinase, fosforilando o IRS1 (do inglês *insulin receptor substrate-1*) em resíduos de serina. Em condições normais, após a ligação da insulina, o receptor de insulina (RI) sofre uma auto-fosforilação em resíduos de tirosina, passando a ter função de tirosina-quinase. O IRS1, então, é fosforilado pelo RI também em resíduos de tirosina, e, a partir daí é desencadeada uma cascata de sinalização intracelular em resposta ao estímulo da insulina (translocação de transportadores de glicose do tipo 4 para a membrana plasmática, transcrição de genes relacionados ao anabolismo e ao metabolismo da glicose, por exemplo). No entanto, quando o IRS1 sofre fosforilação em resíduos de serina, como acontece por ação da enzima JNK, a transdução intracelular da insulina é prejudicada, o que se manifesta clinicamente como resistência à ação desse hormônio [10, 11] (ver **Figura 4**).

Figura 4: ilustração da interferência da resposta inflamatória intracelular na sinalização da insulina, pela ativação de TLR. (Abreviações: TLR, *toll-like receptor*; IRS-1, do inglês *insulin receptor substrate 1*; PKR, do inglês *protein kinase R*; IKK, do inglês *inhibitor of kappa-B kinase*; JNK, do inglês *c-jun N-terminal kinase*; IRF, do inglês *interferon regulatory fator*; NF-κB, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; AP-1, do inglês *activator protein*; RE, retículo endoplasmático).

Adaptado de Gregor & Hotamisligil [10].

Descobertas recentes identificaram a expressão e a funcionalidade dos TLR4 não só em células do sistema imune, mas também em células insulino-sensíveis, como adipócitos [64, 65], células musculares esqueléticas [66, 67, 64] e células-β pancreáticas [68, 69]. Consequentemente, a ativação do TLR4 nesses tecidos tem o potencial de interferir dramaticamente na resposta do organismo à insulina. O principal antígeno reconhecido pelo TLR4 é o LPS, no entanto, desde 2001, sabemos que alguns tipos de ácidos graxos saturados também são capazes de ativá-lo em macrófagos [70], e em células adiposas e musculares [64]. Interessantemente, com a ativação de TLR4 por esses ácidos graxos, adipócitos são estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e

IL-6) [64], retroalimentando o processo inflamatório do tecido adiposo, bem como a instalação da resistência periférica à insulina.

Como podemos notar, o estado inflamatório é de fundamental importância na patofisiologia da SM. Estratégias que busquem modular a inflamação observada principalmente no TAB de indivíduos obesos podem ser valiosas para o tratamento das morbidades associadas a esse quadro. Hotamisligil e colaboradores, naquele mesmo trabalho publicado em 1993 [7], obtiveram resultados positivos na resposta glicêmica de ratos obesos após neutralização de TNF- α pela administração intravenosa de um receptor solúvel para essa citocina. Fármacos utilizados para o tratamento de artrite reumatoide, como o Etanercepte e Anakinra, cujos mecanismos de ação antagonizam o TNF- α ou a IL-1, respectivamente, mostraram bons resultados na melhora do metabolismo da glicose em pacientes com algum grau de resistência à insulina [15, 71]. A inibição da via do NF- κ B por salicilatos e salsalatos também é capaz de restabelecer a tolerância à glicose tanto em roedores como em seres humanos [16, 17]. No entanto, quais seriam os efeitos adversos desses fármacos, que agem de forma sistêmica e pouco seletiva inibindo vias inflamatórias? Seria o bloqueio da resposta inflamatória prejudicial ao organismo, uma vez que a inflamação é um mecanismo de defesa? Por essas dúvidas, autores sugerem que as estratégias terapêuticas para a inflamação da SM tenham alvos específicos, de forma a não comprometer a resposta imune dos indivíduos [10, 52].

3.5. Fototerapia no tratamento de desordens inflamatórias

Low level light therapy (LLLT), ou terapia com luz de baixa potência (TLBP), consiste em expor células ou tecidos a fontes luminosas (coerentes ou não), em baixas densidades de energia e de potência, de forma que a interação luz-tecido não promova efeito térmico [20]. A aplicação do laser na área da saúde começou poucos anos após as invenções dos lasers de rubi e de hélio-neônio (HeNe), que datam do início da década de 1960. Mester e colaboradores, em 1967, notaram crescimento mais rápido de pelos em camundongos, após exposição do laser em regiões previamente depiladas [72]. Os estudos do grupo continuaram, e os efeitos estimulação de reparação tecidual foram descritos durante a década de 1970 [73, 74]. Atualmente, as aplicações da TLBP se

concentram em algumas grandes áreas: 1) modulação da inflamação; 2) reparação tecidual; 3) manejo da dor e; 4) tratamento de algumas desordens neurológicas [20].

Os efeitos positivos da fototerapia na inflamação podem ser observados bioquimicamente através da redução de marcadores inflamatórios [21, 24, 26, 28, 29], no entanto, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados [20, 24]. No nível celular, evidências sugerem que a TLBP atue na mitocôndria, aumentando a síntese de ATP (trifosfato de adenosina) [75], o que, por consequência, eleva os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), que, por sua vez, são sinalizadores intracelulares capazes de regular a atividade de diversas enzimas, como fosfatases e quinases, e de promover a transcrição gênica [76].

Os comprimentos de onda utilizados para aplicações na área da saúde, particularmente pela via transcutânea, vão do vermelho ao infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), uma vez que a razão entre a profundidade de transmissão no tecido e a absorção pelas principais barreiras ópticas (como melanina, água e hemoglobina) é maior nessa faixa (**Figura 5** e **Figura 6**).

Em relação aos parâmetros a serem adotados, Bjordal *et al* [24] consideram que potências entre 2,5 a 100 mW, com tempos de irradiação variando de 16 a 600 s, totalizando doses de 0,6 a 9,6 J, tanto para os comprimentos de onda vermelho e NIR, têm demonstrado efeitos positivos na redução da inflamação, sendo tão efetivos quanto medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais.

Figura 5: espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico, mostrando a “janela terapêutica”. Retirado de Garcez *et al* [77].

Figura 6: profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda. Retirado de Garcez *et al* [78].

4. FASE I: MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo animal de síndrome metabólica

Com o intuito de desenvolver o modelo animal de SM em nosso laboratório, foi realizado um ensaio-piloto com camundongos machos recém-desmamados da linhagem BALB/c. Os animais, com 18 dias de vida, foram divididos em dois grupos: controle (C, n = 6) e obesidade (OB, n = 6). Os camundongos do primeiro grupo receberam dieta padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia), enquanto que os dedicados à indução da SM foram alimentados com dieta hiperlipídica e hipercalórica (modificada a partir da ração padrão, fornecendo em torno de 40 % de calorias provenientes de lipídios).

Segundo a literatura consultada [49, 48, 50], essa proporção calórica é adequada para indução de obesidade e resistência à insulina em roedores, se mantida no decorrer de pelo menos oito semanas. Considerando as informações que constam no rótulo nutricional da ração padrão Nuvilab CR-1 (**Tabela 4**), julgamos necessário o acréscimo de ingredientes ricos em lipídios, de forma a diminuir a contribuição dos carboidratos, ao mesmo tempo em que o aporte proteico pudesse ser compensado. À ração padrão moída, portanto, foram acrescentados óleo de soja (fonte lipídica), leite em pó (fonte proteica) e xarope de milho (fonte calórica, mas que também serviu para acertar a consistência da nova ração, possibilitando uma moldagem adequada). A composição nutricional da dieta modificada, bem como a proporção dos ingredientes utilizados para sua manufatura, estão descritas na **Tabela 5**.

Tabela 4: informação nutricional da ração padrão Nuvilab CR-1.

Informação nutricional		
Porção de 100g		
Quantidade por porção		%VCT*
Valor energético	339 kcal = 1418 kJ	100,0%
Carboidratos	54 g	63,4 %
Proteínas	22 g	25,9 %
Lipídios	4 g	10,6 %
* % do valor calórico total.		

Tabela 5: informação nutricional e composição da dieta modificada.

Informação nutricional			Composição da ração modificada¹	
Porção de 100g				
Quantidade por porção		%VCT*	Ração padrão	40,0 %
Valor energético	434 kcal = 1816 kJ	100,0%	Óleo de soja	20,0 %
Carboidratos	46 g	42,4%	Xarope de milho	15,0 %
Proteínas	17 g	16,0%	Leite em pó	25,0 %
Lipídios	20 g	41,6%	¹ % em relação à massa	
* % do valor calórico total.				

O preparo da ração foi realizado em condições apropriadas de higiene, e a massa resultante da mistura dos ingredientes foi prensada manualmente em placas de petri de poliestireno (diâmetro = 55 mm), que permaneceram acondicionadas em recipiente tampado, sob refrigeração, até o momento da utilização. A ração modificada apresentou boa aceitação pelos animais, sendo oferecida ao grupo (OB) durante todo o período experimental.

No decorrer desse ensaio-piloto, que teve duração de 20 semanas, os animais permaneceram acomodados individualmente em isoladores apropriados, recebendo água e ração (padrão ou modificada) *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Todo o tratamento dos animais obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do IPEN (Nº 95/11, constante

no **ANEXO I**). Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por câmara de CO₂ após anestesia, e, em seguida, necropsiados.

4.2. Acompanhamento dos parâmetros metabólicos

Para obtenção dos valores de glicemia, foram utilizados o glicosímetro portátil OneTouch® Ultra® (Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics) e as fitas reagentes correspondentes. Esse dispositivo de diagnóstico funciona como um biossensor eletroquímico [79]. As amostras de sangue (1 µL) foram adquiridas através de punção caudal, após os animais serem submetidos a restrição alimentar diurna de três horas.

Dados de massa corporal dos camundongos foram coletados durante o decorrer do período experimental, com auxílio de balança apropriada.

Para cada dia de tomada de dados, foram calculadas as médias obtidas para cada grupo.

4.3. Tomografia por coerência óptica

O sistema de OCT (do inglês *optical coherence tomography*) tem seu arranjo óptico baseado no interferômetro de Michelson. A técnica utiliza uma fonte luminosa policromática para obtenção de imagens através de sinais de interferência, após adequado processamento [80, 81]. Na **Figura 7**, apresentamos uma ilustração simplificada de seu sistema.

Figura 7: diagrama esquemático do sistema de OCT. Adaptado de Raele [80].

Resumidamente, o feixe de luz emitido é dividido em duas partes por um elemento óptico. A primeira é direcionada para o espelho de referência, e a segunda para a amostra de interesse. Ao retornarem ao divisor de feixe, a luz refletida pelo espelho de referência e a luz retroespalhada pela amostra são recombinações, gerando sinais de interferência. As intensidades desses sinais são captadas por um detector, de onde serão transmitidas a um computador para análise [80, 81].

Através da modificação do caminho óptico percorrido pela luz até o espelho de referência é possível obter sinais provenientes de diferentes camadas do objeto de estudo. A técnica de OCT, portanto, permite reconstruir em profundidade o perfil de retroespalhamento óptico das amostras. A resolução da imagem obtida depende das características da fonte de luz e a profundidade alcançada vai depender das características ópticas do objeto analisado (coeficiente de espalhamento e de absorção, por exemplo) [80, 81]. Como vantagens para a utilização do sistema OCT, temos a possibilidade de realizá-la *in situ*, *in vivo*, em tempo real, sem promover quaisquer danos à amostra. Dessa forma, foi possível monitorar o ganho de massa adiposa hipodérmica dos animais, com auxílio da ferramenta “Measure” do *ImageJ*, um software de

processamento e análise de imagens de domínio público desenvolvido pelo *National Institutes of Health* (Maryland, USA).

Para obtenção das imagens, era necessário manter os camundongos anestesiados^a em posição de decúbito dorsal, com a região abdominal depilada^b exposta à fonte de luz do equipamento, uma vez que a presença de pelos interfere no sinal da OCT, degradando a qualidade da imagem nas camadas mais profundas.

Para as análises, foi utilizado o equipamento OCP930RS (Thorlabs Inc., disponível no Laboratório de Tomografia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações), que emprega uma fonte luminosa com comprimento de onda central igual a 930 nm, nos seguintes parâmetros:

- Resolução espacial lateral: 6 μm ;
- Resolução espacial axial: 6 μm ;
- Largura de meia-altura: 100 nm.

4.4. Análise estatística

Nosso intuito foi verificar a partir de qual momento a massa corporal (MC) e a glicemia (GLI) seriam estatisticamente diferentes quando comparadas entre os grupos (C) e (OB). Para tanto, foi primeiramente realizada análise de variância por Brown-Forsythe, para atestar homogeneidade na distribuição dessas variáveis. Posteriormente, as médias entre os grupos foram comparadas usando teste *t-Student* em cada semana do período experimental. Consideramos como estatisticamente diferentes valores de $p < 0,05$, e todas as análises foram conduzidas com auxílio da ferramenta OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation).

^a solução de cloridrato de cetamina/xilazina: 80 mg/10 mg por quilograma de massa corporal, diluída em solução-tampão estéril, administrada por via intraperitoneal.

^b creme depilatório à base de tioglicolato após uso de tosquiadeira elétrica.

5. FASE I: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como demonstrado na **Figura 8**, os animais do grupo (OB), já a partir da segunda semana, passaram a exibir massa corporal média significativamente maior quando comparados aos animais recebendo dieta padrão. Ao final do ensaio-piloto, os camundongos que foram alimentados com ração modificada apresentaram um ganho de massa de $147,07 \% \pm 19,7 \%$ em relação à sua massa inicial, praticamente o dobro do que os animais do grupo controle ganharam (**Tabela 6**).

Figura 8: progressão da massa corporal de camundongos BALB/c no decorrer de 20 semanas. (médias $\pm$ desvio padrão). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6: proporção de ganho em relação à massa inicial dos animais.

Grupos	Massa relativa dos animais durante o ensaio-piloto (%)			
	Semana 2	Semana 7	Semana 13	Semana 20
C	09,91 ($\pm$ 06,97)	34,72 ($\pm$ 17,85)	63,42 ($\pm$ 27,07)	76,09 ($\pm$ 33,26)
OB	19,46 ($\pm$ 02,97)	55,41 ($\pm$ 09,97)	99,68 ($\pm$ 14,19)	147,07 ($\pm$ 19,70)

Médias ($\pm$ desvio padrão).

Com relação à evolução da glicemia, diferenças significativas entre os grupos foram observadas a partir da sexta semana, até o último dia do ensaio (**Figura 9**).

Figura 9: valores médios de glicemia de camundongos BALB/c, no decorrer de 20 semanas (médias $\pm$ desvio padrão). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Através das imagens obtidas por OCT, pudemos avaliar a espessura da hipoderme da região abdominal dos animais (**Figura 10**). Os camundongos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram conteúdo bastante aumentado de gordura no compartimento subcutâneo, de forma que a obtenção das imagens se tornou inviável para esses animais. Devido à sua visível hipertrofia, não era mais possível identificar claramente os limites da camada hipodérmica para quantificar sua espessura.

Figura 10: imagens obtidas através de tomografia por coerência óptica de seções transversais da região abdominal de camundongos BALB/c com 22 semanas de vida. As setas indicam a camada de gordura subcutânea.

Após a eutanásia, os camundongos foram necropsiados para avaliação da cavidade intra-abdominal. Notamos que os animais do grupo OB apresentaram tecido adiposo visceral bastante volumoso, e fígado com características de hepatomegalia e infiltração gordurosa (esteatose hepática), demonstrando que a dieta hiperlipídica foi capaz de promover fenótipo compatível com obesidade visceral (**Figura 11**).

Figura 11: camundongos BALB/c durante necropsia. O fígado, indicado pela seta, se apresenta aumentado (hepatomegalia), com claros sinais de esteatose (coloração amarelada) no camundongo OB (à direita).

6. FASE I: CONCLUSÕES

A dieta modificada desenvolvida pelo nosso grupo atingiu os objetivos de indução de SM em camundongos BALB/c. Devido à praticidade do método escolhido para o monitoramento da glicemia, decidimos por continuar a utilizar o glicosímetro portátil na **FASE II**, e adquirimos também um equipamento portátil para monitorar os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides dos animais.

Devido à impossibilidade de delimitar precisamente a hipoderme para mensurar de forma adequada sua espessura, optamos pela descontinuação do uso do sistema OCT na fase seguinte do presente trabalho.

7. FASE II: MATERIAIS E MÉTODOS

Detalhes sobre o cronograma de experimentação, incluindo os dias de coleta de materiais, encontram-se na **Figura 12**.

Figura 12: delineamento experimental detalhado.

7.1. Modelo animal de síndrome metabólica

De acordo com a disponibilidade do Biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), recebemos camundongos machos e adultos, com 12 semanas de vida, das linhagens BALB/c ($n = 10$) e C57BL/6 ($n = 12$). Durante oito semanas, os animais foram alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica para indução da SM. Essa dieta foi modificada a partir da ração padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia) para fornecer aproximadamente 40 % das calorias provenientes de gorduras, uma vez que dietas hiperlipídicas são conhecidas por induzir obesidade e resistência à insulina em roedores [49, 48, 50]. Conforme descrito na **Fase I**, essa proporção de lipídios foi alcançada através do acréscimo de óleo de soja, xarope de milho e leite em pó à ração padrão Nuvilab CR-1.

As composições nutricionais da ração padrão e da dieta modificada podem ser observadas na **Tabela 4** e na **Tabela 5**.

No decorrer do período experimental, os animais permaneceram acomodados individualmente em isoladores apropriados, recebendo água e ração *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Todo o tratamento dos animais obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do IPEN (Nº 95/11, constante no **ANEXO I**).

7.2. Terapia com luz de baixa potência

Passadas as oito semanas de indução da SM, os animais tratados (grupo LED) foram irradiados sob efeito de anestesia^c, por via transcutânea, sobre a superfície abdominal previamente depilada (**Figura 13**). Os parâmetros de irradiação e as especificações do LED (do inglês *light-emitting diode*) utilizado encontram-se na **Tabela 7** e na **Figura 14**. As irradiações foram realizadas nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21 (**Figura 12**). Animais não-irradiados (grupo controle, C) foram manejados da mesma forma, no entanto, permaneceram sob o equipamento LED desligado durante as sessões de tratamento. Ambos os grupos (C e LED) continuaram a receber a dieta modificada durante o período das irradiações.

^c solução de cloridrato de cetamina/xilazina: 80 mg/10 mg por quilograma de massa corporal, diluída em solução tampão estéril, administrada por via intraperitoneal.

Figura 13: foto de um camundongo da linhagem C57BL/6 durante uma sessão de irradiação.

Tabela 7: especificações do LED e parâmetros de irradiação.

Parâmetros de irradiação

Comprimento de onda	850 nm
Pico de emissão	843,02 nm
Largura espectral FWHM	38,33 nm
Modo de operação	Onda contínua
Potência radiante média	60 mW
Polarização	Randômica
Diâmetro de saída do feixe	0,9 cm
Irradiância de saída	94 mW/cm ²
Perfil do feixe	Multimodo
Área irradiada	3,14 cm ²
Irradiância no alvo	19 mW/cm ²
Tempo de exposição	300 s
Exposição radiante	5,7 J/cm ²

Parâmetros de irradiação (continuação)	
Número de pontos irradiados por sessão	1
Técnica de aplicação	90° em relação à superfície abdominal, altura = 1,5 cm
Número total de sessões por animal	6
Frequência das sessões	Dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21
Energia radiante total	108 J

Figura 14: espectro de emissão do LED, obtido em espectrômetro HR2000 (OceanOptics).

7.3. Avaliação dos parâmetros metabólicos

Para obtenção dos valores de glicemia, foram utilizados o glicosímetro portátil OneTouch® Ultra® (Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics) e as fitas reagentes correspondentes. Esse dispositivo de diagnóstico funciona como um biossensor eletroquímico [79]. As amostras de sangue (1 μ L) foram adquiridas através de punção caudal, após os animais serem submetidos a restrição alimentar diurna de 3 horas.

Triglicérides (TG) e colesterol total (CT) plasmáticos foram quantificados pelo método de fotometria por reflectância com o sistema Accutrend® Plus (Roche). Para coleta do sangue (10 μ L), via plexo retro-orbital, foram utilizadas pipetas Pasteur

(230 mm) estéreis e heparinizadas. Assim como para a glicemia, os animais foram previamente submetidos a uma restrição alimentar diurna de três horas.

Esses métodos analíticos oferecem resultados em poucos minutos, e foram escolhidos devido à sua praticidade, com relatos de uso na literatura [82, 83].

Dados de massa corporal dos camundongos foram coletados durante o decorrer do período experimental, com auxílio de balança apropriada.

7.4. Análise estatística

Teste *t-Student* pareado foi realizado para verificar diferenças na massa corporal (MC), glicemia (GLI), colesterol total (CT) e triglicérides (TG) dos animais após o período de oito semanas de indução da SM, em relação aos seus valores iniciais. Durante o período de tratamento, as médias para as mesmas variáveis foram comparadas entre os grupos (C) e (LED), por meio de teste *t-Student*.

Para comparação dos efeitos globais da LLLT, foram calculadas as áreas sob a curva desses mesmos parâmetros, após normalização em relação aos valores obtidos no dia 0 (valores iniciais, um dia antes do início das irradiações), e plotadas no tempo. Análise de variância por Brown-Forsythe atestou a homogeneidade das variáveis, cujas médias foram comparadas usando teste *t-Student*.

Foram considerados estatisticamente diferentes valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas com auxílio da ferramenta OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation).

8. FASEII: RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Indução da síndrome metabólica

8.1.1. Camundongos C57BL/6

Ao final das primeiras oito semanas, os animais da linhagem C57BL/6 ganharam 9,48 g, o que corresponde a um ganho de massa de 32,16 %, e massa corporal média final de $38,78 \text{ g} \pm 3,91 \text{ g}$. Quando comparados a camundongos da mesma idade, nossos animais apresentaram um ganho de massa significativo [84, 85], demonstrando que a dieta modificada foi suficiente para promover a obesidade.

Valores aumentados de glicemia foram observados após esse período inicial de oito semanas (**Tabela 8** e **Figura 15**). Apesar da técnica de *clamp* euglicêmico e hiperinsulinêmico ser o padrão-ouro para avaliação da sensibilidade à insulina, tal metodologia mostra-se bastante complexa, demandando uma série de coletas de amostras de sangue, o que limita sua aplicação em modelos animais de pequenos roedores [86]. No entanto, em conjunto com os resultados de aumento de massa corporal, a hiperglicemia observada pode indicar, indiretamente, uma diminuição da resposta sistêmica ao estímulo da insulina [87, 88], e podemos inferir o estabelecimento de um estado de resistência à insulina.

Em relação aos valores plasmáticos de CT e TG, apesar de uma discreta, porém estatisticamente significativa redução nos níveis de CT, nenhuma alteração substancial na magnitude desses parâmetros foi observada após o período inicial de oito semanas (**Tabela 8** e **Figura 15**).

Tabela 8: parâmetros metabólicos após as primeiras oito semanas de dieta hipercalórica de camundongos C57BL/6, em comparação aos seus valores iniciais.

Parâmetros metabólicos	Antes (semana 0)	Depois (semana 8)
Massa relativa (%)	----	132,16 (± 08,59)
Glicemia (mg/dL)	145,75 (± 29,01)	165,92 (± 25,30)
Triglicérides (mg/dL)	154,17 (± 22,07)	175,92 (± 28,08)
Colesterol total (mg/dL)	179,42 (± 05,76)	172,83 (± 05,15)

média (± desvio padrão); **valores em negrito:** $p < 0,05$.

Figura 15: comparação dos parâmetros metabólicos de camundongos C57BL/6 antes e depois do período de indução da síndrome metabólica. As colunas representam as médias e as barras referem-se aos respectivos desvios padrão. Colesterol total, glicose e massa corporal: $p < 0,05$.

8.1.2. Camundongos BALB/c

Diferentemente do que foi observado em relação aos camundongos C57BL/6, a linhagem BALB/c não respondeu da forma esperada à dieta modificada. Ao final das primeiras oito semanas de indução da SM, os animais apresentaram um ganho de massa relativo de 15,61 % (5,47 g), resultando em uma massa corporal final média de $39,88 \text{ g} \pm 7,04 \text{ g}$. Quanto aos demais parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas quando da comparação em relação ao período inicial (**Tabela 9 e Figura 16**). Esses dados estão em aparente conflito com o que alcançamos em nosso ensaio-piloto, quando camundongos alimentados com dieta modificada apresentaram elevação nos valores de glicemia a partir da sexta semana (**Figura 9**). No entanto, devemos lembrar que, àquela ocasião, os animais tinham apenas quinze dias de vida no início dos experimentos. Nessa segunda fase, trabalhamos com camundongos já adultos, que, de acordo com o que observamos, não responderam da mesma forma à indução de SM através da dieta.

Tabela 9: parâmetros metabólicos após as primeiras oito semanas de dieta hipercalórica (BALB/c), em comparação aos seus valores iniciais.

Parâmetros metabólicos	Antes (semana 0)	Depois (semana 8)
Massa relativa (%)	---	115,61 (± 13,67)
Glicemia (mg/dL)	146,50 (± 28,59)	146,30 (± 29,19)
Triglicérides (mg/dL)	193,10 (± 55,52)	207,80 (± 50,24)
Colesterol total (mg/dL)	181,20 (± 06,83)	178,00 (± 06,36)

média (± desvio padrão); **valores em negrito:** $p < 0,05$.

Figura 16: comparação dos parâmetros metabólicos de camundongos BALB/c antes e depois do período de indução da síndrome metabólica. As colunas representam as médias e as barras referem-se aos respectivos desvios padrão. Massa corporal: $p < 0,05$.

8.2. Terapia com luz de baixa potência

A evolução dos parâmetros metabólicos durante o período das irradiações pode ser acompanhada na **Figura 17** e na **Figura 18**, para os camundongos da linhagem C57BL/6 e BALB/c, respectivamente.

Em geral, quando comparadas dia-a-dia, as variáveis analisadas não se mostraram diferentes entre os grupos (C) e (LED). Podemos notar que as respostas dos animais foram muito semelhantes em relação às concentrações de CT e TG, para ambas as linhagens estudadas.

Para a glicemia, houve uma diferença significativa no último dia de coleta nos camundongos C57BL/6 (**Figura 17**), quando os animais do grupo (LED) já haviam sido submetidos a todas as seções de irradiação. Essa talvez seja uma resposta ao tratamento proposto, embora um período de acompanhamento maior seja necessário para verificarmos se essa diferença se manteria no tempo.

Figura 17: evolução dos parâmetros metabólicos de camundongos C57BL/6 dos grupos (C) e (LED) durante período de tratamento com luz de baixa potência. Os valores estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Os quadrados ao longo do eixo x indicam os dias em que os animais receberam as irradiações.

Outro achado interessante foi a abrupta elevação nos valores de glicemia dos animais BALB/c, grupo (LED), vinte e quatro horas após a primeira irradiação (**Figura 18**). Camundongos do grupo (C) apresentaram $129,6 \text{ mg/dL} \pm 22,79 \text{ mg/dL}$, enquanto que os irradiados (LED) apresentaram $174,6 \text{ mg/dL} \pm 15,24 \text{ mg/dL}$ de glicose plasmática. Esse resultado foi contrário ao esperado, e pode ter sido uma resposta aguda à primeira sessão de irradiação. No entanto, como essa diferença não persistiu ao longo das semanas seguintes, concluímos que alguma interferência na manipulação dos animais possa ter gerado tal resultado. Para os próximos estudos no tema, recomendamos que a glicemia vinte e quatro horas após as irradiações seja aferida para verificar se esse comportamento é mantido.

Figura 18: evolução dos parâmetros metabólicos de camundongos BALB/c dos grupos (C) e (LED) durante período de tratamento com luz de baixa potência. Os valores estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Os quadrados ao longo do eixo x indicam os dias em que os animais receberam as irradiações.

Após o início das irradiações, a massa corporal dos animais apresentou um comportamento diferente em relação ao que vínhamos observando durante a indução da SM: os camundongos da linhagem C57BL/6 emagreceram, enquanto que animais BALB/c mantiveram massa corporal estável (**Tabela 10**). Uma vez que esse comportamento foi o mesmo tanto para o grupo (C) como para o grupo (LED), não podemos descartar que a metodologia posta em prática durante o período das irradiações teve alguma influência no metabolismo energético desses animais. O protocolo de sedação, necessário para manter os animais imóveis e em posição de decúbito dorsal durante as irradiações, foi também utilizado nos animais do grupo (C). Dessa forma, nossa hipótese é que a recuperação dos camundongos não foi satisfatória após a administração dos medicamentos (cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina), ainda que tenham sido utilizados nas doses recomendadas [89].

Tabela 10: comparação da massa corporal de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 antes do início (semana 8) e após as sessões irradiação (semana 11).

Grupos	Massa corporal (g)	
	Semana 8	Semana 11
C57BL/6:		
C	38,65 ($\pm$ 3,96)	34,12 ($\pm$ 2,68)*
LED	38,90 ($\pm$ 4,24)	35,50 ($\pm$ 3,80)*
BALB/c:		
C	38,51 ($\pm$ 6,75)	39,11 ($\pm$ 5,95)
LED	41,25 ($\pm$ 7,84)	40,61 ($\pm$ 5,53)

Valores apresentados em médias $\pm$ desvio padrão

* $p < 0,05$, após teste *t-Student* pareado, comparando a massa corporal dos animais na semana 11 versus na semana 8.

Com auxílio da ferramenta *Integrate* (Analysis>>Mathematics>>Integrate) do software OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation), foi calculada a área matemática dos parâmetros metabólicos (normalizados em relação aos seus valores iniciais, obtidos antes do início da primeira irradiação), para cada animal, ao longo do período de tratamento com luz de baixa potência. As médias de área sob a curva (AUC) foram calculadas para os grupos (C) e (LED), e os resultados estão apresentados na **Figura 19**. Tanto o grupo irradiado (LED) como o controle (C) apresentou um comportamento semelhante no decorrer do período de tratamento em relação aos parâmetros avaliados. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após análise estatística.

Com outra abordagem terapêutica, Aquino Junior e colaboradores [90] encontraram resultados diferentes após irradiação em músculos das patas de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Roedores sedentários apresentaram diminuição dos níveis de CT e TG após irradiação com laser ($\lambda = 830$ nm) em um protocolo que buscou avaliar efeitos adjuvantes da LLLT em animais treinados. Essa divergência pode ter ocorrido devido ao fato dos nossos animais não terem apresentado aumento nos níveis plasmáticos de CT e TG após as oito semanas de indução da SM, o que talvez possa ser alcançado se esse tempo de indução fosse prolongado. Em relação aos parâmetros de irradiação, os autores acima mencionados optaram por usar densidades de energia e de potência muito mais altas, apesar de ter sido entregue metade da energia total que

utilizamos em cada sessão. O protocolo de irradiação também foi mais extenso, sendo realizadas cinco sessões por semana, durante oito semanas. O nosso período de tratamento englobou um total de seis sessões, que ocorreram ao longo de três semanas. Prolongar o tempo de tratamento deve ser considerado em estudos futuros.

Como mencionado anteriormente, ao nosso conhecimento não existem estudos propondo utilizar a fototerapia para tratar o componente inflamatório da SM. Com isso em vista, nossos parâmetros de irradiação foram baseados na aplicação da LLLT em condições de inflamação crônica, que geralmente adotam menores densidades de energia e de potência [22, 24, 25, 27, 35] do que foi adotado por Aquino e colaboradores [90]. Reconhecemos oportunidade para aprimorar o uso da LLLT no tratamento da SM, e outros protocolos de irradiação devem ser avaliados.

Figura 19: comparação entre os grupos irradiado (LED) e não irradiado (C) em relação aos parâmetros metabólicos avaliados. As colunas representam as médias de área sob a curva e as barras referem-se aos respectivos desvios padrão.

9. FASE II: CONCLUSÕES

Nossos achados demonstram que a síndrome metabólica pôde ser induzida com sucesso em camundongos adultos da linhagem C57BL/6. Considerando os parâmetros de irradiação adotados, a terapia com luz de baixa potência não se mostrou efetiva para alterar massa corporal, glicemia, colesterol total e triglicérides de camundongos alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization, "Burden: mortality, morbidity and risk factors," em *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, Genebra, WHO Press, 2011.
- [2] World Health Organization, Preventing chronic diseases: a vital investment. WHO global report, Genebra: WHO Pres, 2005.
- [3] World Health Organization, "An estimation of the economic impact of chronic noncommunicable diseases in selected countries," 2006. [Online]. Available: http://www.who.int/chp/working_paper_growth%20model29may.pdf. [Acesso em Setembro 2013].
- [4] K. G. M. M. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. T. James, C. M. Loria e S. C. Smith Jr., "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International," *Circulation*, vol. 120, pp. 1640-1645, 2009.
- [5] S. M. Grundy, H. B. Brewer Jr, J. I. Cleeman, S. C. Smith, C. Lenfant, American Heart Association e National Heart, Lung, and Blood Institute, "Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition," *Circulation*, vol. 109, n. 3, pp. 433-8, 2004.
- [6] G. S. Hotamisligil, P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson e B. M. Spiegelman, "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, pp. 2409-2415, Maio 1995.
- [7] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill e B. M. Spiegelman, "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance," *Science*, vol. 259, pp. 87-91, 1993.
- [8] C. Hofmann, K. Lorenz, S. S. Braithwaite, J. R. Colca, B. J. Palazuk, G. S. Hotamisligil e B. M. Spiegelman, "Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance," *Endocrinology*, vol. 134, n. 1, pp. 264-70, 1994.
- [9] G. S. Hotamisligil e B. M. Spiegelman, "Tumor necrosis factor-alpha: a key component of the obesity-diabetes link," *Diabetes*, vol. 43, n. 11, pp. 1271-8, 1994.
- [10] M. F. Gregor e G. S. Hotamisligil, "Inflammatory mechanisms in obesity," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, p. 415-45, 2011.
- [11] J. M. Olefsky e C. K. Glass, "Macrophages, inflammation and insulin resistance," *Annual Review of Physiology*, vol. 72, p. 219-46, 2010.
- [12] B. L. Wajchenberg, "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome," *Endocrine Reviews*, vol. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

- [13] C. A. Gilbert e J. M. Slingerland, "Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression," *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, p. 45–57, 2013.
- [14] B. B. Aggarwal, "Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 30, p. 173–99, 2010.
- [15] C. M. Larsen, M. Faulenbach, A. Vaag, A. Vølund, J. A. Ehses, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen e M. Y. Donath, "Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus," *N Engl J Med*, vol. 356, n. 15, pp. 1517-26, 2007.
- [16] M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee, L. Hansen, Z. W. Li, M. Karin e S. E. Shoelson, "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta," *Science*, vol. 293, n. 5535, pp. 1673-7, 2001.
- [17] A. B. Goldfine, R. Silver, W. Aldhahi, D. Cai, E. Tatro, J. Lee e S. E. Shoelson, "Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes," *Clin Transl Sci*, vol. 1, n. 1, pp. 36-43, 2008.
- [18] S. Sun, Y. Ji, S. Kersten e L. Qi, "Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue," *Annu Rev Nutr*, vol. 32, pp. 261-86, 2012.
- [19] World Health Organization, "2008-2013 action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases. Prevent and control cardiovascular diseases, cancers, chronic respiratory diseases and diabetes," WHO Press, Geneva, 2008.
- [20] H. Chung, T. Dai, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, J. D. Carroll e M. R. Hamblin, "The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy," *Ann Biomed Eng.*, vol. 40, n. 2, pp. 516-33, 2012.
- [21] R. C. Pallotta, J. M. Bjordal, L. Frigo, E. C. P. Leal Junior, S. Teixeira, R. L. Marcos, L. Ramos, F. M. Messias e R. A. B. Lopes-Martins, "Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation," *Lasers Med Sci*, vol. 27, n. 1, pp. 71-8, 2012.
- [22] A. P. Castano, T. Dai, I. Yaroslavsky, R. Cohen, W. A. Apruzzese, M. H. Smotrich e M. R. Hamblin, "Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time," *Lasers Surg Med*, vol. 39, n. 6, pp. 543-50, 2007.
- [23] D. Pires, M. Xavier, T. Araújo, J. A. Silva Junior, F. Aimbire e R. Albertini, "Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat," *Lasers Med Sci*, vol. 26, n. 1, pp. 85-94, 2011.
- [24] J. M. Bjordal, R. A. B. Lopes-Martins, J. Joensen e V. V. Iversen, "The anti-inflammatory mechanism of low level laser therapy and its relevance for clinical use in physiotherapy," *Physical Therapy Reviews*, vol. 15, n. 4, pp. 286-293, 2010.
- [25] A. C. Ucerio, B. Sabban, A. Benito-Martin, S. Carrasco, S. Joeken e A. Ortiz, "Laser therapy in metabolic syndrome-related kidney injury," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 89, p. 953–960, 2013.
- [26] F. A. M. Oliveira, A. C. M. Moraes, A. P. Paiva, V. Schinzel, M. Correa-Costa, P. Smedo, A. Castoldi, M. A. Cenedeze, R. S. M. F. Oliveira, M. G. Bastos, N. O. S. Câmara e H. Sanders-Pinheiro, "Low-level laser therapy decreases renal interstitial

- fibrosis," *Photomed Laser Surg*, vol. 30, n. 12, pp. 705-13, 2012.
- [27] C. M. França, C. L. Santana, C. B. Takahashi, A. N. Alves, A. P. S. Mernick, K. P. S. Fernandes, D. F. T. Silva, S. K. Bussadori e R. A. Mesquita-Ferrari, "Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats," *Lasers Med Sci*, vol. 28, n. 5, pp. 1331-8, 2013.
- [28] Y.-L. Hsieh, L.-W. Chou, P.-L. Chang, C.-C. Yang, M.-J. Kao e C.-Z. Hong, "Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a)," *J Comp Neurol*, vol. 520, n. 13, pp. 2903-16, 2012.
- [29] L. Gavish, L. S. Perez, P. Reissman e S. D. Gertz, "Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression," *Lasers Surg Med*, vol. 40, n. 5, pp. 371-8, 2008.
- [30] L. R. Sousa, B. N. Cavalcanti e M. M. Marques, "Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages," *Photomed Laser Surg*, vol. 27, n. 1, pp. 37-42, 2009.
- [31] P. Avci, T. T. Nyame, G. K. Gupta, M. Sadasivam e M. R. Hamblin, "Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review," *Lasers Surg Med.*, vol. 45, n. 6, pp. 349-57, 2013.
- [32] R. F. Jackson, D. D. Dedo, G. C. Roche, D. I. Turok e R. J. Maloney, "Low-level laser therapy as a non-invasive approach for body contouring: a randomized, controlled study," *Lasers Surg Med*, vol. 41, n. 10, pp. 799-809, 2009.
- [33] M. K. Caruso-Davis, T. S. Guillot, V. K. Podichetty, N. Mashtalir, N. V. Dhurandhar, O. Dubuisson, Y. Yu e F. L. Greenway, "Efficacy of low-level laser therapy for body contouring and spot fat reduction," *Obes Surg.*, vol. 21, n. 6, pp. 722-9, 2011.
- [34] R. Neira, J. Arroyave, H. Ramirez, C. L. Ortiz, E. Solarte, F. Sequeda e M. I. Gutierrez, "Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue," *Plast Reconstr Surg*, vol. 110, n. 3, pp. 912-22, 2002.
- [35] D. B. Höfling, M. C. Chavantes, A. G. Juliano, G. G. Cerri, M. Knobel, E. M. Yoshimura e M. C. Chammas, "Low-level laser in the treatment of patients with hypothyroidism induced by chronic autoimmune thyroiditis: a randomized, placebo-controlled clinical trial," *Lasers Med Sci*, vol. 28, n. 3, pp. 743-53, 2013.
- [36] G. M. Reaven, "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.," *Diabetes*, vol. 37, n. 12, pp. 1595-607, 1988.
- [37] A. J. Kennedy, K. L. J. Ellacott, V. L. King e A. H. Hasty, "Mouse models of the metabolic syndrome," *Disease Models & Mechanisms*, vol. 3, pp. 156-66, 2010.
- [38] T. A. Lutz e S. C. Woods, "Overview of animal models of obesity," *Curr Protoc Pharmacol*, vol. Chapter 5, n. Unit5.61, 2012.
- [39] J. M. Friedman e J. L. Halaas, "Leptin and the regulation of body weight in mammals," *Nature*, vol. 395, n. 6704, pp. 763-70, 1998.
- [40] J. Alfredo Martínez, L. Enríquez, M. J. Moreno-Aliaga e A. Martí, "Genetics of obesity," *Public Health Nutr*, vol. 10, n. 10A, pp. 1138-44, 2007.

- [41] A. J. Walley, J. E. Asher e P. Froguel, "The genetic contribution to non-syndromic human obesity," *Nat Rev Genet*, vol. 10, n. 7, pp. 431-42, 2009.
- [42] C. Becskei, T. A. Lutz e T. Riediger, "Reduced fasting-induced activation of hypothalamic arcuate neurons is associated with hyperleptinemia and increased leptin sensitivity in obese mice," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 299, n. 2, pp. R632-41, 2010.
- [43] S. Collins, T. L. Martin, R. S. Surwit e J. Robidoux, "Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics," *Physiology & Behavior*, vol. 81, pp. 243-248, 2004.
- [44] D. Harbilas, A. Brault, D. Vallerand, L. C. Martineau, A. Saleem, J. T. Arnason, L. Musallam e P. S. Haddad, "Populus balsamifera L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model," *J Ethnopharmacol*, vol. 141, n. 3, pp. 1012-20, 2012.
- [45] M. Rebuffé-Scrive, R. Surwit, M. Feinglos, C. Kuhn e J. Rodin, "Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus," *Metabolism*, vol. 42, n. 11, pp. 1405-9, 1993.
- [46] R. S. Surwit, M. N. Feinglos, J. Rodin, A. Sutherland, A. E. Petro, E. C. Opara, C. M. Kuhn e M. Rebuffé-Scrive, "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice," *Metabolism*, vol. 44, n. 5, pp. 645-51, 1995.
- [47] S. P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber, J. Lemieux, S. Slaymaker, K. Vaddi, I. Charo, R. L. Leibel e A. W. Ferrante, "CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding," *J Clin Invest*, vol. 116, n. 1, pp. 115-24, 2006.
- [48] S. K. Panchal e L. Brown, "Rodent models for metabolic syndrome research," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2011, 2011.
- [49] R. Buettner, J. Schölmerich e L. C. Bollheimer, "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents," *Obesity*, vol. 15, n. 4, pp. 798-808, 2007.
- [50] D. Bagnol, H. A. Al-Shamma, D. Behan, K. Whelan e A. J. Grottick, "Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents," *Curr Protoc Neurosci*, vol. 59, p. 9.38.1–9.38.13, 2012.
- [51] V. Mohamed-Ali, J. H. Pinkney e S. W. Coppack, "Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ," *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 22, n. 12, pp. 1145-58, 1998.
- [52] M. Blüher, "Adipokines – removing road blocks to obesity," *Mol Metab*, vol. 3, n. 3, pp. 230-40, 2014.
- [53] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold e J. M. Friedman, "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue," *Nature*, vol. 372, n. 6505, pp. 452-32, 1994.
- [54] A. M. Ingalls, M. M. Dickie e G. D. Snell, "Obese, a new mutation in the house mouse," *J Hered*, vol. 41, n. 12, pp. 317-8, 1950.
- [55] K. P. Hummel, M. M. Dickie e D. L. Coleman, "Diabetes, a new mutation in the mouse," *Science*, vol. 153, n. 3740, pp. 1127-8, 1966.
- [56] G. R. Hervey, "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats," *J Physiol*,

- vol. 145, n. 2, pp. 336-352, 1959.
- [57] D. L. Coleman e K. P. Hummel, "Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice," *Am J Physiol*, vol. 217, n. 5, pp. 1298-304, 1969.
 - [58] D. L. Coleman, "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice," *Diabetologia*, vol. 9, n. 4, pp. 294-8, 1973.
 - [59] C. Procaccini, V. Pucino, V. De Rosa, G. Marone e G. Matarese, "Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease," *Front Immunol*, vol. 7, n. 5, p. 143, 2014.
 - [60] G. Fantuzzi e R. Faggioni, "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis," *J Leukoc Biol*, vol. 68, n. 4, pp. 437-46, 2000.
 - [61] C. Martín-Romero, J. Santos-Alvarez, R. Goberna e V. Sánchez-Margalet, "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes," *Cell Immunol*, vol. 199, n. 1, pp. 15-24, 2000.
 - [62] S. Loffreda, S. Q. Yang, H. Z. Lin, M. L. Brengman, D. J. Wang, A. S. Klein, G. B. Bulkley, C. Bao, P. W. Noble, M. D. Lane e A. M. Diehl, "Leptin regulates proinflammatory immune responses," *FASEB J*, vol. 12, n. 1, pp. 57-65, 1998.
 - [63] P. A. Hopkins e S. Sriskandan, "Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond," *Clin Exp Immunol*, vol. 140, n. 3, pp. 395-407, 2005.
 - [64] H. Shi, M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin e J. S. Flier, "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance," *J Clin Invest*, vol. 116, n. 11, pp. 3015-25, 2008.
 - [65] M. J. Song, K. H. Kim, J. M. Yoon e J. B. Kim, "Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 346, n. 3, pp. 739-45, 2006.
 - [66] S. M. Reyna, S. Ghosh, P. Tantiwong, C. S. R. Meka, P. Eagan, C. P. Jenkinson, E. Cersosimo, R. A. DeFronzo, D. K. Coletta, A. Sriwijitkamol e N. Musi, "Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects," *Diabetes*, vol. 57, n. 10, pp. 2595-602, 2008.
 - [67] R. A. Frost, G. J. Nystrom e C. H. Lang, "Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 283, n. 3, pp. R698-709, 2002.
 - [68] H. M. Garay-Malpartida, R. F. Mourão, M. Mantovani, I. A. Santos, M. C. Sogayar e A. C. Goldberg, "Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis," *BMC Immunol*, vol. 12, n. 18, 2011.
 - [69] M. Li, L. Song, X. Gao, W. Chang e X. Qin, "Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes," *Exp Mol Med*, vol. 44, n. 4, pp. 260-7, 2012.
 - [70] J. Y. Lee, K. H. Sohn, S. H. Rhee e D. Hwang, "Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4," *J Biol Chem*, vol. 276, n. 20, pp. 16683-9, 2001.
 - [71] T. L. Stanley, M. V. Zanni, S. Johnsen, S. Rasheed, H. Makimura, H. Lee, V. K. Khor, R.

- S. Ahima e S. K. Grinspoon, "TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 96, n. 1, pp. E146-50, 2011.
- [72] E. Mester, B. Szende e J. G. Tota, "Effect of laser on hair growth of mice," *Kiserl Orvostud*, vol. 19, pp. 628-31, 1967.
- [73] E. Mester, T. Spiray, B. Szende e J. G. Tota, "Effect of laser rays on wound healing," *Am J Surg*, vol. 122, pp. 532-5, 1971.
- [74] E. Mester, S. Nagylucskay, A. Doklen e S. Tisza, "Laser stimulation of wound healing," *Acta Chir Acad Sci Hung*, vol. 17, pp. 49-55, 1976.
- [75] T. Karu, "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells," *J Photochem Photobiol B*, vol. 49, n. 1, pp. 1-17, 1999.
- [76] G. Leonarduzzi, B. Sottero, G. Testa, F. Biasi e G. Poli, "New insights into redox-modulated cell signaling," vol. 17, n. 36, pp. 3994-4006, 2011.
- [77] A. S. Garcez, M. S. Ribeiro e S. c. Núñez, "Mecanismos de terapia laser de baixa potência," em *Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia*, Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 27-43.
- [78] A. S. Garcez, M. S. Ribeiro e S. C. Núñez, "Interação laser-tecido biológico e princípios de dosimetria," em *Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia*, Rio de Janeiro, Elsevier, 2012, pp. 14-27.
- [79] J. D. Newman e A. P. Turner, "Home blood glucose biosensors: a commercial perspective," *Biosens Bioelectron*, vol. 20, n. 12, pp. 2435-53, 2005.
- [80] M. P. Raele, *Desenvolvimento da técnica de tomografia por coerência óptica de autocorrelação e melhoramento de resolução axial por análise de sinal via transformada de Fourier.*, Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- [81] A. C. B. Cara, *Avaliação do processo de desenvolvimento de desmineralização em esmalte dental humano utilizando a técnica de tomografia por coerência óptica*, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [82] P.-H. Lou, N. Gustavsson, Y. Wang, G. K. Radda e W. Han, "Increased lipolysis and energy expenditure in a mouse model with severely impaired glucagon secretion," *PLoS ONE*, vol. 6, n. 10, p. e26671, 2011.
- [83] C. Messier e P. Kent, "Repeated blood glucose measures using a novel portable glucose meter," *Physiology & Behavior*, vol. 4, pp. 807-11, 1995.
- [84] The Jackson Laboratory, "Body weight information - JAX® Mice Strain C57BL/6J," [Online]. Available: <http://jaxmice.jax.org/support/weight/000664.html>. [Acesso em Jan 2014].
- [85] Charles River Laboratory, "C57BL/6 Mouse - Growth Chart," [Online]. Available: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>. [Acesso em Jan 2014].

- [86] R. Muniyappa, S. Lee, H. Chen e M. J. Quon, "Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 294, n. 1, pp. E15-E26, 2008.
- [87] B. Geloneze e M. A. Tambascia, "Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance," *Arq Bras Endocrinol Metab*, vol. 50, n. 2, pp. 208-15, 2006.
- [88] R. N. Bergman, S. P. Kim, I. R. Hsu, K. J. Catalano, J. D. Chiu, M. Kabir, J. M. Richey e M. Ader, "Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk," *Am J Med*, vol. 120, n. 2 Suppl 1, pp. S3-8, 2007.
- [89] J. A. Davis, "Mouse and rat anesthesia and analgesia," *Curr Protoc Neurosci*, vol. Appendix 4B, 2008.
- [90] A. E. Aquino Junior, M. Sene-Fiorese, F. R. Paolillo, F. O. Duarte, J. C. Oishi, A. A. Pena Junior, A. C. G. O. Duarte, M. R. Hamblin, V. S. Bagnato e N. A. Parizotto, "Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet," *Lasers Med Sci*, vol. 28, n. 5, pp. 1271-1280, 2013.

ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Comitê de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 95/11/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE NO PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO DE CAMUNDONGOS COM SÍNDROME METABÓLICA”** de responsabilidade da pesquisadora **DRA. MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 22 de dezembro de 2011.

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

ANEXO 2: ARTIGO PUBLICADO (PROCEEDINGS SPIE WEST 2014)

Treating metabolic syndrome's metaflammation with low level light therapy: preliminary results

Tania Mateus Yoshimura^a, Ilka Tiemy Kato^a, Alessandro Melo Deana^b, Martha Simões Ribeiro^a

^aCenter for Laser and Applications, Nuclear and Energy Research Institute, Av. Professor Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil, 05508-000; ^bPost-graduate program in Biophotonics applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, Av. Dr. Adolpho Pinto, 109, Barra Funda, São Paulo, SP, Brazil, 01156-050

ABSTRACT

Metabolic syndrome comprises a constellation of morbidities such as insulin resistance, hyperinsulinemia, atherogenic dyslipidemia, dysglycemia and obesity (especially abdominal). Metabolic alterations are observed in major insulin target organs, increasing the risk of cardiovascular diseases, type-2 diabetes and therefore mortality. Tissue alterations are characterized by immune cells infiltrates (especially activated macrophages). Released inflammatory mediators such as TNF- α induce chronic inflammation in subjects with metabolic syndrome, since inflammatory pathways are activated in the neighboring cells. The intra-abdominal adipose tissue appears to be of particular importance in the onset of the inflammatory state, and strategies contributing to modulate the inflammatory process within this adipose tissue can mitigate the metabolic syndrome consequences. Considering the low level light therapy (LLLT) recognized benefits in inflammatory conditions, we hypothesized this therapeutic approach could promote positive effects in modulating the inflammatory state of metabolic syndrome. That being the scope of this study, male C57BL/6 mice were submitted to a high-fat/high-fructose diet among 8 weeks to induce metabolic syndrome. Animals were then irradiated on the abdominal region during 21 days using an 850 nm LED (6 sessions, 300 seconds per session, 60 mW output power, ~ 6 J/cm² fluence, ~ 19 mW/cm² fluence rate). Before and during treatment, blood was sampled either from the retro-orbital plexus or from tail puncture for glucose, total cholesterol and triglycerides analysis. So far our results indicate no alterations on these metabolic parameters after LLLT. For further investigations, blood was collected for plasma inflammatory cytokine quantification and fresh *ex vivo* samples of liver and intra-abdominal adipose tissue were harvested for immunohistochemistry purposes.

Keywords: meta-inflammation, phototherapy, diabetes, cholesterol, triglycerides, obesity

INTRODUCTION

According to the World Health Organization [1], in 2008, 36 million people died due to noncommunicable diseases (NCDs). This number corresponds to 63 % of all deaths in that year. Infirmities like diabetes, cardiovascular diseases (CVD), cancers and respiratory diseases account for almost 80 % of all NCD deaths.

Responsible for nearly half of all NCDs deaths, CVDs and diabetes are preventable in 80% of the cases [2]. Their socioeconomic burden affects not only mortality and treatment costs, but also decreases quality of life and productivity. For an example, in 2005 Brazil have lost USD 2.7 billion in the national income by reason of diabetes and CVDs, a financial loss that can triplicate by 2015, as reported by WHO [3].

The Type-2 diabetes mellitus (T2DM) and CVD major risk factors are comprised in a medical condition known as metabolic syndrome (MetS). Dysglycemia, hypertension, atherogenic dyslipidemia and obesity (especially abdominal obesity) are strong predictors for the development and progression of the aforementioned diseases. It is yet to be determined which of these risk factors are MetS causes or consequences, but there is consensus throughout many experts

societies that impaired insulin sensitivity and central adiposity are common denominators among individuals with MetS [4]. By some means, these two conditions contribute to metabolic alterations leading to the onset of T2DM and CVDs.

Metaflammation [5], the characteristic inflammation observed in obese individuals, may play an important role in MetS. Hostamisliligil et al [6] were the firsts reporting an increased tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in the adipose tissue of obese individuals showing that their findings in murine models of obesity [7, 8, 9] also occurred in humans. Since 1995, studies have been portraying the obese white adipose tissue as an organ richly permeated by leukocytes, having not only increased TNF- α levels, but also other cytokines and chemokines [10, 11, 12, 13, 14]. This inflammatory state is closely related to the development of insulin resistance once Toll-like receptors (TLRs) pathways activation leads to intracellular inhibition of insulin signaling [10, 11].

Several authors have highlighted the importance of inhibiting the inflammatory pathways in the MetS therapeutic management. Studies focusing on modulating the inflammation without impairing the subject's immune responses are considered of particular importance [10, 11, 15]. The World Health Organization on its latest global strategy for the prevention and control of NCDs [16] emphasizes the need to promote and support multisectoral and multidimensional investigations that generate or strengthen strategies to prevent and control these diseases. In this sense, we propose a non-invasive treatment without side effects, aiming to reduce the MetS characteristic inflammation using low level light therapy (LLLT).

According to Chung et al [17] the therapeutic use of LLLT in the red and near infrared wavelengths can be divided in three main areas: 1) reducing inflammation and edema; 2) wound healing and tissue repair and 3) pain relief and treatment from neurological disorders. Some examples from murine models include edema, inflammatory infiltrate and proinflammatory cytokines expression reduction in joint disorders [18, 19, 20, 21]; renal function improvement, decreased blood pressure and lowered expression of cytokines in renal disease [22, 23]; decreased fibrosis in diabetic rats with muscle injury [24]; and pain reduction after induced neuropathic pain [25]. *In vitro* assays have shown LLLT's immunomodulatory potential as demonstrated by lower expression and synthesis of inflammatory cytokines by murine monocytes/macrophages stimulated by proinflammatory agents like lipopolysaccharides or interferon- γ [26, 27]. Notwithstanding its recognized benefits on inflammatory conditions, in regard to the adipose tissue LLLT is more focused on aesthetic aspects [28]. Reported cases of spot fat reduction [29, 30] and "fat liquefaction" [31] are a few examples.

To our knowledge, there are no other studies using LLLT to treat MetS, a chronic, systemic and persistent inflammatory condition. Therefore, our main objective is to investigate this new application to phototherapy.

METHODOLOGY

2.1 Metabolic syndrome animal model

Male adult C57BL/6 mice were fed *ad libitum* a hypercaloric, high-fat, and fructose enriched chow during 8 weeks in order to induce MetS. The diet was modified from the standard chow to obtain at least 40 % of calories from fat, since high-fat diets are known to induce obesity and insulin resistance in rodents [32, 33, 34]. The diet's nutritional composition can be seen in

Table 1. Throughout the experiments, animals were individually housed in appropriate cages under a 12 h daylight cycle. All the procedures were in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [35] and were approved by the institutional animal ethics committee (number 95/11/CEUA-IPEN/SP).

Table 1: Hypercaloric, high-fat and fructose enriched diet nutritional composition.
* percent of total caloric value

NUTRITIONAL COMPOSITION		
	Amount per 100 g	%TCV*
Energy	434 kcal = 1816 kJ	100,0%
Carbohydrates	46 g	42,4%
Proteins	17 g	16,0%
Total fat	20 g	41,6%

2.2 LLLT

Following the eight weeks diet stage, animals were transcutaneously irradiated on the depilated abdominal surface with a one-spot light emitting diode (LED), under anesthesia (ketamine:xylazine: 80 mg:10 mg per kilogram of body mass). All irradiation parameters and LED specifications are shown in

Table 2: LED specifications and irradiation parameters

and Figure 1. Irradiations were performed at the days 1, 3, 7, 10, 14 and 21 after the eight weeks period. Animals from the control group (C) were handled in the same manner as the LED group, but they were placed under the powered off apparatus. Both groups continued receiving the modified diet throughout the experimental procedures.

Table 2: LED specifications and irradiation parameters

Irradiation Parameters	
Center wavelength [nm]	843.02
Spectral bandwidth (FWHM) [nm]	38.33
Operating mode	Continuous wave
Average radiant power [mW]	60
Polarization	Random
Aperture diameter [cm]	0.900
Irradiance at aperture [mW/cm ²]	94
Beam profile	Multimode
Beam spot area at target [cm ²]	3.14
Irradiance at target [mW/cm ²]	19
Exposure duration [s]	300
Radiant exposure [J/cm ²]	5.7
Radiant energy [J]	18
Number of points irradiated	1
Area irradiated [cm ²]	3.14
Application technique	90° to the abdominal surface, distanced 1.5 cm
Number of treatment sessions	6
Frequency of treatment sessions	days 1, 3, 7, 10, 14 and 21
Total radiant energy [J]	108

Figure 1: LED's spectral power obtained by using an OceanOptics HR2000 spectrometer

2.3 Metabolic parameters assessment

Blood glucose levels were assessed by a portable glucometer (OneTouch® Ultra®, Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics) using the appropriate test strips. Blood samples were obtained via tail puncture after a 3 h daytime food restriction.

Total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) blood levels were quantified using the Accutrend® Plus (Roche) system, after 3 h daytime food restriction. Blood samples (10 μ L) from the retro-orbital plexus were collected with heparinized Pasteur pipettes.

Body mass data were collected during the experimental course.

2.4 Statistical analysis

Paired Student's *t*-test was performed to verify differences in body mass and blood glucose, TC and TG levels after the eight weeks period for MetS diet induction. In order to compare the global effects of LLLT, the areas under the curve were calculated using the variable's normalized values in relation to their initial values (at day 0, one day before the first irradiation session) plotted against time. Variance analysis (Lavene and Brown-Forsythe) were performed to attest normal distribution and means were compared using one-way ANOVA. Statistic relevance were considered for $p < 0.05$. Analyses were conducted using OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Metabolic syndrome diet induction

After the experiment's first eight weeks, animals gained 9.48 g, which corresponds to a 32.16 % mass gain and an average final body mass of $38.78 \text{ g} \pm 3.91 \text{ g}$. This result is higher when compared to age-matched C57BL/6 fed with normal diet [36, 37], indicating significant increased mass gain.

Augmented fasting blood glucose levels were observed after the hypercaloric diet stage (Table 3). Although hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamp is the gold-standard insulin sensitivity assessment method, it is rather complex and demands serial blood sample collection, which limits its application in small rodent models [38]. In

conjunction with the increased body mass, however, hyperglycemia can indirectly indicate a decreased responsiveness to the insulin's metabolic actions [39, 40], and we can infer an insulin resistance state settlement.

In relation to TC and TG blood levels, although a discrete but significant decrease in the first variable level, non substantial changes in magnitude were observed after the 8 weeks diet period (Table 3).

Table 3: metabolic parameters after eight weeks of hypercaloric diet.

* $p < 0.05$

Variables	Before diet (week 0)	After diet (week 8)
Relative mass gain	1.0	1.3216 $\pm$ 0.0859*
Blood glucose	145.75 $\pm$ 29.01 mg/dL	165.92 $\pm$ 25.30 mg/dL*
Triglycerides	154.17 $\pm$ 22.07 mg/dL	175.92 $\pm$ 28.08 mg/dL
Total cholesterol	179.42 $\pm$ 05.76 mg/dL	172.83 $\pm$ 05.15 mg/dL*

3.2 Low level light therapy

As can be seen in Figure 2, both irradiated (LED) and non-irradiated (C) groups presented a similar behavior during the treatment period in relation to the assessed metabolic parameters, showing no differences after statistical analysis.

Approaching different LLLT targets, Aquino Junior et al [41] have found dissonant data after irradiating the paw muscles of high-fat fed rats. Sedentary rodents presented decreased TC and TG levels after 830 nm laser irradiation in a protocol that aimed to evaluate the laser's adjuvant effects on trained animals. This divergence might be due to the fact that our animals didn't show increased TG and TC levels after the eight weeks diet period, which could possibly be achieved if we had extended the period of MetS diet induction. Regarding the irradiation parameters, the mentioned authors preferred to use much higher energy density and power density, although delivering half of our total energy per session, 5 days/week, during 8 weeks. Our treatment encompassed a total of 6 sessions throughout 3 weeks, and prolonging its time course is to be considered.

As mentioned before, to our knowledge there are no studies using phototherapy to treat the inflammatory component of MetS. That being said, our irradiation parameters were based on LLLT application on chronic inflammatory conditions, which usually adopts lower energy density and power density [19, 21, 22, 24, 42]. We recognize opportunities for improvement and other irradiation protocols should be evaluated. Nevertheless it is important to highlight that after the last irradiation session, animals were euthanized and blood was collected for plasma inflammatory cytokine quantification and fresh *ex vivo* samples of liver and intra-abdominal adipose tissue were harvested for immunohistochemistry purposes. Further analyses are being conducted, and our investigations might find other LLLT effects in the context of MetS.

Figure 2: Comparison between irradiated (LED) and non-irradiated (C) groups in relation to the assessed metabolic parameters (BM = body mass, TG = triglycerides, TC = total cholesterol and GLU = blood glucose). Columns represent the means of area under the curve (AUC) and bars stand for Standard Deviation.

CONCLUSIONS

Our findings demonstrate that MetS was successfully induced. Considering the adopted irradiation parameters, LLLT showed no effects on body mass and blood glucose, total cholesterol and triglycerides levels of C57BL/6 mice fed with hypercaloric, high-fat and fructose enriched diet during eight weeks for MetS induction.

Acknowledgments: We are grateful to the National Nuclear Energy Commission (CNEN) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support.

REFERENCES

- [1] World Health Organization, "Burden: mortality, morbidity and risk factors," in *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, Geneva, WHO Press, 2011.
- [2] World Health Organization, Preventing chronic diseases: a vital investment. WHO global report, Geneva: WHO Press, 2005.

- [3] World Health Organization, "An estimation of the economic impact of chronic noncommunicable diseases in selected countries," 2006. [Online]. Available: http://www.who.int/chp/working_paper_growth%20model29may.pdf. [Accessed October 2013].
- [4] K. G. M. M. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. T. James, C. M. Loria and S. C. Smith Jr., "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity" *Circulation*, vol. 120, pp. 1640-1645, 2009.
- [5] G. S. Hotamisligil, "Inflammation and metabolic disorders," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 860-7, 2006.
- [6] G. S. Hotamisligil, P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson and B. M. Spiegelman, "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, pp. 2409-2415, 1995.
- [7] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill and B. M. Spiegelman, "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance," *Science*, vol. 259, pp. 87-91, 1993.
- [8] C. Hofmann, K. Lorenz, S. S. Braithwaite, J. R. Colca, B. J. Palazuk, G. S. Hotamisligil and B. M. Spiegelman, "Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance," *Endocrinology*, vol. 134, no. 1, pp. 264-70, 1994.
- [9] G. S. Hotamisligil and B. M. Spiegelman, "Tumor necrosis factor- α : a key component of the obesity-diabetes link," *Diabetes*, vol. 43, no. 11, pp. 1271-8, 1994.
- [10] M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil, "Inflammatory mechanisms in obesity," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, p. 415-45, 2011.
- [11] J. M. Olefsky and C. K. Glass, "Macrophages, inflammation and insulin resistance," *Annual Review of Physiology*, vol. 72, p. 219-46, 2010.
- [12] B. L. Wajchenberg, "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome," *Endocrine Reviews*, vol. 21, no. 6, p. 697-738, 2000.
- [13] C. A. Gilbert and J. M. Slingerland, "Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression," *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, p. 45-57, 2013.
- [14] B. B. Aggarwal, "Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 30, p. 173-99, 2010.
- [15] S. Sun, Y. Ji, S. Kersten and L. Qi, "Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue," *Annu Rev Nutr*, vol. 32, pp. 261-86, 2012.
- [16] World Health Organization, "2008-2013 action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases. Prevent and control cardiovascular diseases, cancers, chronic respiratory diseases and diabetes," WHO Press, Geneva, 2008.
- [17] H. Chung, T. Dai, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, J. D. Carroll and M. R. Hamblin, "The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy," *Ann Biomed Eng.*, vol. 40, no. 2, pp. 516-33, 2012.
- [18] R. C. Pallotta, J. M. Bjordal, L. Frigo, E. C. P. Leal Junior, S. Teixeira, R. L. Marcos, L. Ramos, F. M. Messias and R. A. B. Lopes-Martins, "Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation," *Lasers Med Sci*, vol. 27, no. 1, pp. 71-8, 2012.
- [19] A. P. Castano, T. Dai, I. Yaroslavsky, R. Cohen, W. A. Apruzzese, M. H. Smotrich and M. R. Hamblin, "Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time," *Lasers Surg Med*, vol. 39, no. 6, pp. 543-50, 2007.
- [20] D. Pires, M. Xavier, T. Araújo, J. A. Silva Junior, F. Aimbire and R. Albertini, "Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat," *Lasers Med Sci*, vol. 26, no. 1, pp. 85-94, 2011.
- [21] J. M. Bjordal, R. A. B. Lopes-Martins, J. Joensen and V. V. Iversen, "The anti-inflammatory mechanism of low level laser therapy and its relevance for clinical use in physiotherapy," *Physical Therapy Reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 286-293, 2010.
- [22] A. C. Ucero, B. Sabban, A. Benito-Martin, S. Carrasco, S. Joeken and A. Ortiz, "Laser therapy in metabolic

- syndrome-related kidney injury," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 89, p. 953–960, 2013.
- [23] F. A. M. Oliveira, A. C. M. Moraes, A. P. Paiva, V. Schinzel, M. Correa-Costa, P. Semedo, A. Castoldi, M. A. Cenedeze, R. S. M. F. Oliveira, M. G. Bastos, N. O. S. Câmara and H. Sanders-Pinheiro, "Low-level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis," *Photomed Laser Surg*, vol. 30, no. 12, pp. 705-13, 2012.
- [24] C. M. França, C. L. Santana, C. B. Takahashi, A. N. Alves, A. P. S. Mernick, K. P. S. Fernandes, D. F. T. Silva, S. K. Bussadori and R. A. Mesquita-Ferrari, "Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats," *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 5, pp. 1331-8, 2013.
- [25] Y.-L. Hsieh, L.-W. Chou, P.-L. Chang, C.-C. Yang, M.-J. Kao and C.-Z. Hong, "Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a)," *J Comp Neurol*, vol. 520, no. 13, pp. 2903-16, 2012.
- [26] L. Gavish, L. S. Perez, P. Reissman and S. D. Gertz, "Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression," *Lasers Surg Med*, vol. 40, no. 5, pp. 371-8, 2008.
- [27] L. R. Sousa, B. N. Cavalcanti and M. M. Marques, "Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages," *Photomed Laser Surg*, vol. 27, no. 1, pp. 37-42, 2009.
- [28] P. Avci, T. T. Nyame, G. K. Gupta, M. Sadasivam and M. R. Hamblin, "Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review," *Lasers Surg Med*, vol. 45, no. 6, pp. 349-57, 2013.
- [29] R. F. Jackson, D. D. Dedo, G. C. Roche, D. I. Turok and R. J. Maloney, "Low-level laser therapy as a non-invasive approach for body contouring: a randomized, controlled study," *Lasers Surg Med*, vol. 41, no. 10, pp. 799-809, 2009.
- [30] M. K. Caruso-Davis, T. S. Guillot, V. K. Podichetty, N. Mashtalir, N. V. Dhurandhar, O. Dubuisson, Y. Yu and F. L. Greenway, "Efficacy of low-level laser therapy for body contouring and spot fat reduction," *Obes Surg*, vol. 21, no. 6, pp. 722-9, 2011.
- [31] R. Neira, J. Arroyave, H. Ramirez, C. L. Ortiz, E. Solarte, F. Sequeda and M. I. Gutierrez, "Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue," *Plast Reconstr Surg*, vol. 110, no. 3, pp. 912-22, 2002.
- [32] R. Buettner, J. Schölmerich and L. C. Bollheimer, "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents," *Obesity*, vol. 15, no. 4, pp. 798-808, 2007.
- [33] S. K. Panchal and L. Brown, "Rodent models for metabolic syndrome research," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2011, 2011.
- [34] D. Bagnol, H. A. Al-Shamma, D. Behan, K. Whelan and A. J. Grottick, "Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents," *Curr Protoc Neurosci*, vol. 59, p. 9.38.1–9.38.13, 2012.
- [35] National Research Council, Guide for care and use of laboratory animals, Washington: The National Academies Press, 1996.
- [36] The Jackson Laboratory, "Body weight information - JAX® Mice Strain C57BL/6J," [Online]. Available: <http://jaxmice.jax.org/support/weight/000664.html>. [Accessed Jan 2014].
- [37] Charles River Laboratory, "C57BL/6 Mouse - Growth Chart," [Online]. Available: <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>. [Accessed Jan 2014].
- [38] R. Muniyappa, S. Lee, H. Chen and M. J. Quon, "Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 294, no. 1, pp. E15-E26, 2008.
- [39] B. Geloneze and M. A. Tambascia, "Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance," *Arq Bras Endocrinol Metab*, vol. 50, no. 2, pp. 208-15, 2006.
- [40] R. N. Bergman, S. P. Kim, I. R. Hsu, K. J. Catalano, J. D. Chiu, M. Kabir, J. M. Richey and M. Ader, "Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk," *Am J Med*, vol. 120, no. 2 Suppl 1, pp. S3-8, 2007.
- [41] A. E. Aquino Junior, M. Sene-Fiorese, F. R. Paolillo, F. O. Duarte, J. C. Oishi, A. A. Pena Junior, A. C. G. O. Duarte, M. R. Hamblin, V. S. Bagnato and N. A. Parizotto, "Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet," *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 5, pp. 1271-1280, 2013.
- [42] D. B. Höfling, M. C. Chavantes, A. G. Juliano, G. G. Cerri, M. Knobel, E. M. Yoshimura and M. C. Chammas, "Low-level laser in the treatment of patients with hypothyroidism induced by chronic autoimmune thyroiditis: a randomized, placebo-controlled clinical trial," *Lasers Med Sci*, vol. 28, no. 3, pp. 743-53, 2013.