AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**FOTOBIMODULAÇÃO NA SÍNDROME METABÓLICA:
EFEITOS NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM DE CAMUNDONGOS**

Tania Mateus Yoshimura

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

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

**São Paulo
2019**

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

**FOTOBIMODULAÇÃO NA SÍNDROME METABÓLICA:
EFEITOS NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E MARROM DE CAMUNDONGOS**

Tania Mateus Yoshimura

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

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

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: FAPESP, processo 2014/0256-1; CNPq, processo 165837/2014-4

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

MATEUS YOSHIMURA, T. **Fotobiomodulação na síndrome metabólica**: efeitos nos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos. 2019. 89 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mateus Yoshimura, Tania

Fotobiomodulação na síndrome metabólica: efeitos nos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos / Tania Mateus Yoshimura; orientadora Martha Simões Ribeiro. -- São Paulo, 2019.

89 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Obesidade. 2. Diabetes. 3. Fototerapia. I. Simões Ribeiro, Martha, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo incentivo, apoio e dedicação, que me permitiram trilhar e desbravar esses caminhos (às vezes tortuosos) da ciência. ...Eu sei que minha educação exigiu vários sacrifícios, e esse trabalho é uma pequena forma de agradecer por tudo que vocês investiram em mim. Desejo sinceramente que bons frutos ainda venham de toda a dedicação que foi necessária para a minha formação. Sem vocês, eu nada seria.

À Martha, por ter me aberto as portas para entrar nesse mundo acadêmico, e pela paciência (haja paciência!) que me permitiu continuar nessa jornada durante todos esses anos.

Aos que passaram pelo LATO-CLA antes de mim, que de alguma forma deixaram um pouco de si nesse grupo, e ajudaram a criar esse ambiente tão rico no qual agora me formo (em especial: Renato, Ilka, Aguinaldo, Sayuri, Alessandra, China, Caetano e Sílvia). ...É aquele velho ditado de enxergar mais longe por estar sobre ombros de gigantes.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço imensamente pelas contribuições e pelo carinho com que fui recebida. Parte de todos vocês está aqui, nessa dissertação. Espero ter correspondido às expectativas!

Aos que se tornaram muito mais do que colegas de laboratórios, e agora são meus companheiros pra vida: Lucas, Camila, Fernanda e Ismael. Vocês são meus presentes, e sem suas palavras, carinho e apoio, jamais teria chegado até aqui.

Aos colegas do CLA, meus agradecimentos pela companhia nesses anos de trabalho.

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.

À Professora Dra. Denise Zezell, por ter fornecido equipamentos necessários à realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, por ter cedido o espaço do seu laboratório para a realização de vários experimentos.

À Professora Dra. Elizabeth Ferreira Martinez, pelo auxílio no processamento das lâminas.

Ao Professor Dr. Mauro Cortez, por ter cedido a infraestrutura de seu laboratório, que foi indispensável para a obtenção de resultados importantes.

Ao Professor Dr. Alessandro Deana, que confeccionou uma das fontes de luz utilizadas nos protocolos de tratamento.

Aos técnicos do CLA, Tort, Marcão e Paulinho, sempre dispostos a me ajudar.

À Verinha, Antônia e Dona Marta, agradeço por estarem sempre prontas a ajudar. Os sorrisos, a acolhida, fizeram do meu tempo aqui mais feliz

À FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

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

A Deus, que é o início e o fim, e o porquê.

APOIO FINANCEIRO

Esse trabalho recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2014/0256-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 165837/2014-4).

RESUMO

MATEUS YOSHIMURA, T. ***Fotobiomodulação na síndrome metabólica***: efeitos nos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos. 2019. 89 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

A síndrome metabólica (SM) é uma condição clínica que agrupa uma variedade de morbidades, como intolerância à glicose e obesidade. Na obesidade, o tecido adiposo branco (TAB) apresenta características inflamatórias que interferem na ação da insulina, levando à ocorrência de Diabetes do tipo 2. O tecido adiposo marrom (TAM), que tem como principal função a termogênese através da oxidação mitocondrial de cadeias carbônicas, se encontra hiporresponsivo aos estímulos clássicos na SM, como, por exemplo, a exposição ao frio. Estratégias para modular os processos inflamatórios do TAB e ativar o metabolismo do TAM podem atenuar as consequências da SM. Os reconhecidos efeitos anti-inflamatórios e de ativação do metabolismo mitocondrial da fotobiomodulação (PBM) indicam que essa poderia ser uma proposta terapêutica para a SM. Sendo esse o nosso foco de estudo, camundongos adultos, machos, da linhagem C57BL/6 receberam dieta hiperlipídica para indução da SM. Os animais foram então irradiados usando um dispositivo LED sobre a superfície abdominal ($\lambda = 850$ nm) ou interescapular ($\lambda = 660$ nm) para modular a inflamação do TAB ou ativar o TAM, respectivamente. O tratamento consistiu em 6 sessões de irradiação, distribuídas no decorrer de 21 dias. Apesar de não terem apresentado alterações na massa corporal e Índice de Lee, os animais irradiados na região abdominal (HFABD850) apresentaram 50 % menos células inflamatórias no TAB epididimal e também apresentaram melhora no teste de tolerância à glicose 24 h após a última sessão de tratamento. Nos animais obesos irradiados na região interescapular (HFTAM660), as irradiações promoveram aumento de duas vezes na massa do TAM, além de aumento da temperatura dorsal e da captação de ^{18}F -FDG após exposição a baixas temperaturas. O soro desses animais (HFTAM660) também se mostrou mais semelhante ao de animais eutróficos. Nossos achados indicam que a PBM, nos parâmetros investigados, pode ser aplicada ao tratamento da SM.

Palavras-chave: obesidade, diabetes, fototerapia

ABSTRACT

MATEUS YOSHIMURA, T. ***Photobiomodulation in metabolic syndrome: effects on white and brown adipose tissues from mice***. 2019. 89 p. Thesis (PhD in Nuclear Technology), Nuclear Energy Research Institute IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Metabolic syndrome (MS) is a clinical condition comprising a variety of morbidities, such as glucose intolerance and obesity. The white adipose tissue (WAT) of obese individuals presents inflammatory characteristics that directly impairs insulin response, and may lead to the development of type 2 diabetes. Brown adipose tissue (BAT), whose main function is thermogenesis through mitochondrial oxidation of carbon chains, is also altered in SM. In obese individuals, this tissue is hyporesponsive to classical stimuli such as cold exposure. Strategies modulating the inflammatory processes within WAT and activating the metabolism of BAT can therefore attenuate the consequences of the SM. The recognized anti-inflammatory effects and the activation of mitochondrial metabolism of photobiomodulation (PBM) allow us to suppose that this could be an interesting therapeutic proposal for MS. As this was our study focus, adult male C57BL/6 mice received a high-fat diet to induce MS. The animals were then irradiated using an LED device on the abdominal ($\lambda = 850$ nm) or interscapular ($\lambda = 660$ nm) surfaces to modulate WAT inflammation or activate BAT, respectively. The treatment consisted of 6 irradiation sessions, distributed over 21 days. Although no changes in body mass and Lee index were observed, animals irradiated in the abdominal region (HFABD850) showed 50% fewer inflammatory cells in the epididymal TAB and also presented improvement in glucose tolerance test 24 h after the last treatment session. In obese animals irradiated in the interscapular region (HFTAM660), the treatment promoted a two-fold increase in BAT mass, as well as an increase in dorsal temperature and ^{18}F -FDG uptake after exposure to cold temperatures. The serum of these animals (HFTAM660) was also more similar to that of eutrophic animals. Our findings indicate that PBM, in the investigated parameters, can be applied to the treatment of MS.

Key words: obesity, diabetes, phototherapy

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Gerais	19
2.2. Específicos	19
3. SÍNDROME METABÓLICA	20
3.1 Definição	20
3.2 Modelos animais de síndrome metabólica: roedores	20
3.3 Metodologia	22
3.4 Resultados e discussão	24
4. FOTOBIMODULAÇÃO	27
5. FOTOBIMODULAÇÃO APLICADA AO TECIDO ADIPOSEO BRANCO	30
5.1. Tecido adiposo branco: órgão endócrino	30
5.2. Tecido adiposo branco: inflamação e síndrome metabólica	32
5.3. Metodologia	37
5.4. Resultados	39
5.5. Discussão	47
6. FOTOBIMODULAÇÃO APLICADA AO TECIDO ADIPOSEO MARROM	50
6.1. Background	50
6.2. Metodologia	52
6.3. Resultados	57
6.4. Discussão	73
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	82
ANEXO 2: ARTIGO PUBLICADO	83
MANUSCRITOS PUBLICADOS NO PERÍODO	91

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Critérios diagnósticos para síndrome metabólica	20
Tabela 2. Composição nutricional da ração padrão (Nuvilab CR-1).....	23
Tabela 3. Ingredientes e composição nutricional da dieta hiperlipídica.	23
Tabela 4. Principais moléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo, e seus efeitos metabólicos relacionados à obesidade.	30
Tabela 5. Diferenças encontradas na proporção de células do sistema imune residentes do tecido adiposo branco de camundongos magros e obesos.	33
Tabela 6. Descrição dos grupos experimentais.	37
Tabela 7. Características do dispositivo LED e os parâmetros de irradiação adotados.....	38
Tabela 8. Descrição dos grupos experimentais.	54
Tabela 9. Características dos dispositivos LED e os parâmetros de irradiação a serem adotados.	55
Tabela 10. Analitos de interesse e respectivas regiões espectrais ^{111,112} . HDL: <i>high density liproteins</i> , lipoproteínas de alta densidade; LDL: <i>low density lipoptroteins</i> , lipoproteínas de baixa densidade.	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mortes por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ocorridas no ano de 2016..	14
Figura 2. Evolução da massa corporal e Índice de Lee durante período de indução da síndrome metabólica.	25
Figura 3. Resposta ao teste de tolerância à glicose intra-peritoneal antes e após 8 semanas de indução do modelo de síndrome metabólica.	26
Figura 4. Evolução dos testes de tolerância à glicose durante o período de indução da síndrome metabólica.	26
Figura 5. Espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico....	28
Figura 6. Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda.	28
Figura 7. Animal com mutação no gene <i>ob</i> , em relação a camundongo normal	31
Figura 8. Esquema ilustrando as atividades pró e anti-inflamatórias do tecido adiposo branco	33
Figura 9. Ilustração da interferência da resposta inflamatória intracelular na sinalização da insulina, pela ativação de TLR4	36
Figura 10. Evolução da massa corporal normalizada durante o período de tratamento	40
Figura 11. Evolução do índice de Lee durante o período de tratamento	40
Figura 12. Curvas glicêmicas obtidas durante o período de tratamento	42
Figura 13. Evolução do teste de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva durante período de tratamento	42
Figura 14. Diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta normal, hiperlipídica ou obesos tratados com fotobiomodulação na região interescapular	44
Figura 15. Comparação das massas do tecido adiposo de diferentes compartimentos	44
Figura 16. Tratamento com fotobiomodulação na região abdominal promoveu redução na quantidade de leucócitos no tecido adiposo de camundongos com síndrome metabólica	46

Figura 17. Intensidade de fluorescência e porcentagem de área ocupada por células CD11b ⁺ e F4/80 ⁺	47
Figura 18. Proporção de células F4/80 ⁺ :CD11b ⁺ , considerando porcentagem de área e intensidade de fluorescência	47
Figura 19. Localização anatômica de depósitos de tecido adiposo marrom em um ser humano adulto, em condições de exposição ao frio e termoneutralidade	51
Figura 20. Imagens de PET-CT obtidas de seres humanos adultos após administração de ¹⁸ F-FDG e exposição ao frio.	52
Figura 21. Imagens termográficas de animais alimentados com dieta normal e dieta hiperlipídica, imediatamente antes a após exposição ao frio.	53
Figura 22. Diferença na temperatura da região interescapular de camundongos alimentados com dieta normal e dieta hiperlipídica	58
Figura 23. Evolução da massa corporal e Índice de Lee durante tratamento.....	59
Figura 24. Resposta ao teste de tolerância à glicose intra-peritoneal antes e após 15 semanas de indução do modelo de síndrome metabólica.....	60
Figura 25. Evolução dos testes de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva durante indução da síndrome metabólica	60
Figura 26. Evolução da massa corporal normalizada em relação ao dia 0 de cada animal durante tratamento	61
Figura 27. Evolução do índice de Lee normalizado em relação ao dia 0 de cada animal durante tratamento	62
Figura 28. Evolução do teste de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva durante tratamento.....	62
Figura 29. Diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta normal, hiperlipídica ou obesos tratados com fotobiomodulação na região interescapular	64
Figura 30. Comparação das massas do tecido adiposo de diferentes compartimentos	64
Figura 31. Absorbância do soro de camundongos ND, HF e HFTAM660	65
Figura 32. Diferença de absorbância entre os grupos HF e ND e HFTAM660 e HF	66
Figura 33. Dendograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando toda a região espectral.	67

Figura 34. Dendograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando as regiões espectrais da glicose, proteínas totais e triglicerídeos.....	68
Figura 35. Dendograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando as regiões espectrais do colesterol HDL, colesterol LDL (D e E) e colesterol	70
Figura 36. Diferença na temperatura da região interescapular de camundongos alimentados com dieta normal, dieta hiperlipídica e irradiados na região interescapular, durante o período de tratamento	71
Figura 37. Microtomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta normal ou hiperlipídica, dois dias antes e imediatamente após uma sessão de PBM	72
Figura 38. <i>Blot</i> representativo e densidades relativas de UCP1 e Erk 42/44, extraídas de TAM de camundongos obesos e irradiados na região interescapular	72

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹, das 56,9 milhões de mortes ocorridas em 2016, 71 % (40,5 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 2016. Adaptado de World Health Organization, 2018¹.

Apesar de poderem ser prevenidos em 80 % dos casos², 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 doenças³, um prejuízo que alcançou USD 15,67 bilhões em 2014 somente para DM (considerando custos diretos e indiretos do tratamento)⁴.

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^{5,6}. De alguma forma, essas duas condições contribuem para alterações metabólicas que levam ao DM2 e às DCV.

O tecido adiposo branco (TAB) abdominal é destacado como importante componente da SM por apresentar características inflamatórias nos indivíduos obesos. Hotamisligil e colaboradores⁷ 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 obesidade⁸⁻¹⁰, 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)¹¹⁻¹⁵.

O estado inflamatório do TAB 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^{11,12}. 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 foram 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 colaboradores¹⁶, 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). Yuan¹⁷ e Goldfine¹⁸, 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^{11,12,19}. A própria OMS, em sua última estratégia global para prevenção e controle de DCNT²⁰, 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 fotobiomodulação (PBM, do inglês *photobiomodulation*).

De acordo com Chung e colaboradores²¹, 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 desordens articulares²²⁻²⁵; melhora de função renal, redução da pressão arterial e expressão de IL-6 e CCL2 em modelos de doença renal^{26,27}; diminuição da fibrose em injúrias musculares de ratos diabéticos²⁸ e melhora da dor, redução de macrófagos, TNF- α e IL-1 β após indução de dor neuropática²⁹. Estudos *in vitro* reforçam a capacidade imunomodulatória da PBM 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))^{30,31}. Com relação ao tecido adiposo³², as atenções estão mais voltadas à estética, sendo apresentados relatos de redução de gordura localizada^{33,34} e diminuição no tamanho dos adipócitos associada ao extravasamento do conteúdo lipídico de células adiposas retiradas em lipectomia após irradiação com laser³⁵.

Atualmente, poucos trabalhos na literatura reportaram o uso da PBM voltados ao tratamento da SM, que é caracterizada por ser uma condição persistente de inflamação tanto crônica como sistêmica. Em 2015, Sene-Fiorese e colaboradores³⁶ demonstraram a melhora nos parâmetros de porcentagem de massa gorda/massa magra

e índice HOMA-IR (do inglês, *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) quando um protocolo de exercícios físicos foi associado com a PBM. Nosso grupo demonstrou, em 2016, que a irradiação da região abdominal de camundongos C57BL/6 obesos promoveu uma redução de 5x na quantidade de células inflamatórias do TAB intra-abdominal³⁷. Ao nosso conhecimento, esse trabalho foi pioneiro em demonstrar que a PBM, sem associação com exercícios físicos, seria capaz de promover melhoras no quadro de obesidade e hiperglicemia. No ano passado, o grupo de Silva³⁸ tratou camundongos obesos da linhagem Swiss, mas irradiando cinco pontos anatômicos com um laser infravermelho (780 nm). Os resultados obtidos foram bastante interessantes, uma vez que os autores observaram redução na massa dos depósitos de TAB epididimal e mesentérico, acompanhadas de melhora de tolerância à glicose, aumento na fosforilação da Akt epididimal após estímulo por insulina e diminuição JNK fosforilada, também no depósito epididimal.

Outra abordagem proposta para o manejo da SM seria a modulação metabólica do tecido adiposo marrom (TAM), que tem como principal função a termogênese, produzida através da oxidação de esqueletos de carbono. Esse mecanismo é possível graças à presença de UCP1 (proteínas desacopladoras do tipo 1) associadas às ATP sintases mitocondriais dos adipócitos marrons, que, ao invés de produzirem ATP utilizando a força eletromotriz do influxo de prótons, dissipam essa energia na forma de calor^{39,40}.

Até 2009, acreditava-se que o TAM era encontrado nos seres humanos exclusivamente na fase recém-nascida, estando ausente em adultos⁴¹. Uma série de estudos publicados no periódico *The New England Journal of Medicine*⁴²⁻⁴⁴, no entanto, mostrou a presença funcional e em quantidades significativas desse tecido em indivíduos adultos, abrindo um novo ramo de pesquisa para o tratamento da obesidade e de suas morbidades associadas, uma vez que a ativação do TAM aumenta de forma relevante o gasto energético basal por meio da oxidação de cadeias carbônicas originadas principalmente das gorduras e dos carboidratos, consumindo essas fontes de energia para a geração de calor. Sabe-se que, em indivíduos obesos, a quantidade e a atividade do TAM estão diminuídas⁴²⁻⁴⁴, sendo, portanto, de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias direcionadas ao aumento da atividade metabólica desse tecido em obesos, como tratamento adjuvante da obesidade.

Nossa investigação tem como objetivo, portanto, contribuir para a terapêutica da SM através de duas frentes: diminuição do quadro inflamatório crônico observado nessa condição clínica e ativação do TAM, através da PBM.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Avaliar se irradiações com LEDs de emissão vermelha e infra-vermelha promovem efeitos nos tecidos adiposos branco e marrom de camundongos com síndrome metabólica.

2.2. Específicos

- Induzir a síndrome metabólica em camundongos da linhagem C57BL/6 através da administração de dieta hiperlipídica;
- Atestar a hiporresponsividade do tecido adiposo marrom de camundongos com SM por imageamento termográfico e PET-CT;
- Verificar a inflamação no tecido adiposo branco de camundongos com SM;
- Estabelecer um protocolo de tratamento para animais com SM utilizando fontes de luz de emissão vermelha e infravermelha;
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre os parâmetros de massa corporal, Índice de Lee, resposta ao TTG-IP e massa de diferentes compartimentos de tecido adiposo;
- Avaliar os efeitos do tratamento com LED 660 nm na temperatura da região interescapular, no soro e na expressão de UCP1 do TAM interescapular;
- Avaliar os efeitos do tratamento com LED 850 nm nas células inflamatórias do TAB epididimal.

3. SÍNDROME METABÓLICA

3.1 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 paciente⁴⁵. 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^{5,6}.

Tabela 1. Critérios diagnósticos para síndrome metabólica

Critérios		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 al⁴ e Grundy et al⁵.

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 colaboradores⁴⁶ sugerem que a SM, em roedores, seja definida quando dislipidemia *ou* hipertensão arterial *ou* intolerância à glicose 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 ($LepR^{db/db}$)^{46,47}. 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 alimentar⁴⁸. 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^{46,47}. 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 humanos⁴⁶.

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^{49,50}. 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 adulta⁴⁷. 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^{47,51}. Quando recebem uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, a velocidade do ganho de massa corporal aumenta consideravelmente^{52,53}. Esse ganho de massa é acompanhado de uma deposição significativa de gordura no compartimento intra-abdominal^{54,55}, e o tecido adiposo visceral apresenta características marcadamente inflamatórias^{12,19,56}. 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 intolerância à glicose em camundongos^{52,57-60}.

3.3 Metodologia

Ao longo do período experimental, foram utilizados 42 camundongos de linhagem C57BL/6, machos, com 8 a 12 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério do IPEN. Desses animais, dez foram alimentados exclusivamente com ração padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital, Quimtia, cuja composição nutricional está descrita na **Tabela 2**, servindo como controle para o modelo de SM (grupo dieta normal, ou “*normal diet*” – ND). Os demais (grupo “*high-fat*” – HF) receberam dieta hiperlipídica para indução do quadro desejado fornecendo aproximadamente 60 % das calorias provenientes de gorduras, uma vez que essa proporção calórica é conhecida por induzir obesidade e resistência à insulina em roedores⁶⁰⁻⁶³. Esse balanço de nutrientes foi alcançado através de protocolo dietético já estabelecido na literatura⁶⁴, cuja composição se encontra apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 2. Composição nutricional da ração padrão (Nuvilab CR-1).

Nutrientes	%VCT ^a
Proteínas	25,9
Carboidratos	63,4
Lipídeos	10,6

^a%VCT: porcentagem do valor calórico total.

Tabela 3. Ingredientes e composição nutricional da dieta hiperlipídica.

Ingredientes	g/kg
Caseína	258,4
L-cistina	3,9
Dextrose de amido de milho	161,5
Sacarose	88,9
Celulose	74,1
Óleo de soja	32,3
Banha	316,6
Mix mineral AIN93M	47,9
Mix de vitaminas AIN93M	13,7
Colina	2,6
Nutrientes	%VCT ^a
Proteínas	20,0
Carboidratos	20,0
Lipídeos	60,0

^a%VCT: porcentagem do valor calórico total.

Para comprovação da obesidade, o ganho de massa corporal foi aferido através de balança calibrada para cálculo do Índice de Lee^{65,66}, que se encontra demonstrado na equação abaixo, e leva em consideração a massa corporal do animal e seu comprimento naso-anal:

$$\text{Índice de Lee} = \left[\frac{\sqrt[3]{\text{Massa corporal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (mm)}} \right] \times 10^4 \quad (1)$$

Os Índices de Lee calculados e a massa corporal aferida para cada animal foram normalizados em relação aos respectivos valores iniciais, ou seja, antes do início da administração da dieta hiperlipídica, para posteriores comparações entre os grupos.

A intolerância à glicose foi determinada através do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTG-IP): após restrição alimentar de 6 h em período diurno, os animais receberam 2 g de glicose por quilograma de massa corporal através da injeção intraperitoneal de solução estéril de glicose a 20% diluída em soro fisiológico. Amostras de sangue da veia caudal foram coletadas através de punção imediatamente antes e nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração da solução⁶⁷. A glicemia foi

determinada com auxílio de glicosímetro portátil (OneTouch, Johnson & Johnson). Para avaliarmos a resposta ao TTG-IP, foram calculadas as áreas sob as curvas glicêmicas obtidas para os grupos alimentados com dieta normocalórica e dieta hiperlipídica.

No decorrer do tempo experimental, os animais permaneceram acomodados em isoladores apropriados, recebendo água e ração (modificada ou padrão) *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h/12 h, em temperatura controlada (21°C). Todo o tratamento dos animais obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e foram aprovados pelo comitê de ética institucional (143/14/CEUA-IPEN/SP, Anexo).

Os dados de massa corporal e Índice de Lee ao longo do período de indução da SM foram normalizados em relação aos valores iniciais dos animais. A partir das curvas glicêmicas obtidas nos TTG-IP foram calculadas áreas sob a curva. Os resultados, apresentados através de médias $\pm$ erro padrão, foram analisados quanto à sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk, e os testes estatísticos adequados foram empregados para análise dos dados. Foram admitidas como significativas as comparações que apresentaram $p < 0,05$.

3.4 Resultados e discussão

Como podemos observar na **Figura 2**, após 8 semanas com a dieta hiperlipídica, os animais do grupo HF apresentaram índice de Lee e massa corporal significativamente maiores quando comparados aos animais do grupo controle (ND). Ao final do período de indução, animais do grupo HF mostraram um aumento de aproximadamente 38% de massa corpórea e 31% de aumento do índice de Lee.

Figura 2. Evolução da massa corporal (A) e Índice de Lee (B) normalizados em relação à semana 0 de cada animal (médias $\pm$ erro padrão (EP)). Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Somente a partir da oitava semana, os animais HF apresentaram resposta alterada ao TTG-IP, como ilustrado nas **Figura 3** e **Figura 4**. Considerando os dados de AUC, os animais alimentados com dieta hiperlipídica (HF) apresentaram valores 80 % maiores em relação aos animais eutróficos (ND) na oitava semana.

Figura 3. Resposta ao teste de tolerância à glicose intra-peritoneal antes e após 8 semanas de indução do modelo de SM. Os animais do grupo HF apresentaram níveis glicêmicos aumentados em todos os tempos avaliados (exceção para o tempo 0 e 120 min), quando comparados aos animais eutróficos (ND) ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Figura 4. Evolução dos testes de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva (AUC, médias $\pm$ EP) calculada para a curva glicêmica de cada animal (**Figura 3**). Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Consideramos o modelo de indução de SM satisfatório, uma vez que nossos resultados concordam com protocolos de indução dietética através da oferta de ração hiperlipídica previamente descritos^{57,58,60}. Após 8 semanas, os animais apresentaram aumento superior a 30 % tanto para na massa corporal como para Índice de Lee, além de intolerância à glicose, confirmada pelo TTG-IP. A partir desse período, os camundongos estavam aptos a receber o tratamento com fotobiomodulação.

4. FOTOBIMODULAÇÃO

Low level light therapy (LLLT), ou terapia com luz de baixa potência (TLBP), ou fotobiomodulação (PBM) 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 térmico²¹. 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 depiladas⁶⁸. Os estudos do grupo continuaram, e os efeitos na estimulação de reparação tecidual foram descritos durante a década de 1970^{69,70}. Atualmente, as aplicações da PBM se concentram em algumas grandes áreas: 1) modulação da inflamação; 2) reparação tecidual; 3) manejo da dor e; 4) tratamento de algumas desordens neurológicas²¹.

Os efeitos positivos da fototerapia na inflamação podem ser observados bioquimicamente através da redução de marcadores inflamatórios^{22,25,27,29,30}, no entanto, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados^{21,25,71}. No nível celular, evidências sugerem que a TLBP atue na mitocôndria, aumentando a síntese de ATP (trifosfato de adenosina)^{72,73}, 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 gênica⁷⁴.

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^{75,76} (**Figura 5 e Figura 6**).

Em relação aos parâmetros a serem adotados, Bjordal *et al*²⁵ 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*^{75,77}.

Figura 6. Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda. Retirado de Garcez *et al*⁷⁶.

Atualmente, poucos trabalhos na literatura reportaram o uso da PBM voltados ao tratamento da SM, que é caracterizada por ser uma condição persistente de inflamação tanto crônica como sistêmica. Em 2015, Sene-Fiorese e colaboradores³⁶ demonstraram a melhora nos parâmetros de porcentagem de massa gorda/massa magra e índice HOMA-IR (do inglês, *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*) quando um protocolo de exercícios físicos foi associado com a PBM. As participantes do estudo clínico, mulheres com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 30 e 40 kg/m², fizeram parte de um programa de treinamento durante 20 semanas. Ao final de cada sessão de exercício, elas foram irradiadas nas regiões do abdômen, glúteos, e quadríceps e bíceps femurais, utilizando um dispositivo laser emitindo na região do infravermelho próximo (808 nm).

Em 2016, nosso grupo demonstrou que a irradiação da região abdominal de camundongos C57BL/6 obesos promoveu uma redução de 5x na quantidade de células inflamatórias do TAB intra-abdominal³⁷. Após seis sessões de irradiação realizadas ao longo de 3 semanas, utilizando um dispositivo LED de emissão infra-vermelha (850 nm), os animais tratados apresentaram também menor glicemia de jejum quando comparados aos seus controles obesos não-tratados. Ao nosso conhecimento, esse trabalho foi pioneiro em demonstrar que a PBM, sem associação com exercícios físicos ou outras intervenções, seria capaz de promover melhoras no quadro de obesidade e hiperglicemia. Dois anos depois, o grupo de Silva³⁸ tratou camundongos obesos da linhagem Swiss, irradiando cinco pontos anatômicos com um laser infravermelho (780 nm): quadríceps femorais, posteriores da coxa e centro do abdômen. O protocolo de irradiação consistiu em cinco sessões por semana, durante quatro semanas. Os resultados obtidos foram bastante interessantes, uma vez que os autores observaram redução na massa dos depósitos de TAB epididimal e mesentérico, acompanhadas de melhora de tolerância à glicose, aumento na fosforilação da Akt epididimal após estímulo por insulina e diminuição JNK fosforilada, no mesmo depósito adiposo.

5. FOTOBIMODULAÇÃO APLICADA AO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

5.1. Tecido adiposo branco: 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 cérebro⁷⁸. 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 hemodinâmica⁷⁹. As moléculas secretadas pelo tecido adiposo são denominadas “adipocinas”, e suas principais funções se encontram descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4. 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-1β: 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, 2014⁷⁹.

A leptina foi identificada em 1994 pelo grupo de Zhang⁸⁰, mas seu papel sobre a regulação da massa corporal já era vislumbrado desde 1950, quando uma mutação genética espontânea em camundongos foi descrita⁸¹. 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 7**). 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 colaboradores⁸², 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 7. À direita da imagem, animal com mutação no gene *ob*, em relação a camundongo normal. Retirado de Ingalls *et al*, 1950⁸¹.

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 supra-fisiológicas, mas, por algum mecanismo à época desconhecido, não respondiam a esses estímulos⁸³⁻⁸⁵.

Foi somente na década de 1990, com os ensaios de clonagem posicional⁸⁰, 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^{86,87}. 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^{86,88,89}.

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 4**, temos TNF- α , IL-6, IL-1 β e CCL2, e seus efeitos na SM serão abordados na seção seguinte.

5.2. Tecido adiposo branco: 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 5**. Há um aumento importante de macrófagos e linfócitos T CD8⁺/CD4⁺, e diminuição de células T regulatórias. Com o auxílio da **Figura 8**, 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^{11,12,19}. Dentre os diferentes depósitos corporais de tecido adiposo branco, diversos trabalhos na literatura têm relacionado os compartimentos abdominais com a etiologia dessa inflamação associada à obesidade, sendo esses depósitos subcutâneos e intra-abdominais, tais como inguinais, gonadais, mesentéricos, omentais e retroperitoneais⁹⁰⁻⁹³.

Tabela 5. 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*¹⁹

Figura 8. 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*¹⁹.

Olefsky & Glass¹² destacam que, em camundongos e seres humanos obesos, os macrófagos podem representar mais de 50 % 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^{11,12,19}.

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 eutróficos⁸. 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 insulina⁸. 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 jejum⁷. 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 insulina¹⁰. 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*)^{11,12,19}. 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 patógenos⁹⁴. 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-inflamatórias⁹⁴⁻⁹⁸. 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 IκB (do inglês *inhibitor of kappa-B*). Uma vez fosforilado, o IκB sofre dissociação do NFκB (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 CCL2⁹⁵.

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^{11,12} (ver **Figura 9**).

Figura 9. 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 factor*; 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 & Hotamisligil¹¹.

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^{95,96}, células musculares esqueléticas^{95,97,98} e células-β pancreáticas^{99,100}. 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 macrófagos¹⁰¹, e em células adiposas e musculares⁹⁵. Interessantemente, com a ativação de TLR4 por esses ácidos graxos, adipócitos são estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6)⁹⁵, 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 1993⁸, 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^{16,102}. 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^{17,18}. 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^{11,79}, sendo a PBM, portanto, uma abordagem interessante e inovadora que poderia ser aplicada para o tratamento da SM, focando na inflamação observada no TAB.

5.3. Metodologia

5.3.1. Fotobiomodulação aplicada ao tecido adiposo branco

Uma vez que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica (HF) apresentaram diferenças significativas na massa corporal, Índice de Lee e na resposta ao TTG-IP, foi dado início ao protocolo de tratamento. Os animais foram então divididos em novos grupos experimentais (**Tabela 6**).

Tabela 6. Descrição dos grupos experimentais.

Grupos	n	Alvo	Comprimento de onda (nm)
ND	7	-----	-----
HF	7	-----	-----
HFABD850	7	Abdominal	850

Os animais do grupo HFABD850 foram irradiados por via transcutânea sobre a superfície abdominal previamente depilada. Os parâmetros de irradiação e as especificações do LEDs (do inglês *light-emitting diode*) utilizado encontram-se na **Tabela 7**. As irradiações foram realizadas nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21, seguindo um protocolo previamente desenvolvido pelo nosso grupo ³⁷. Animais não irradiados (ND e HF) foram manejados da mesma forma, no entanto, permaneceram sob o equipamento LED desligado durante as sessões de tratamento. Os animais dos grupos HF e HFABD850 continuaram a receber a dieta modificada durante todo o período das irradiações, e todos os animais foram acompanhados quanto à evolução da massa corporal, Índice de Lee e tolerância ao teste de glicose intraperitoneal até o término do período de tratamento.

Tabela 7. Características do dispositivo LED e os parâmetros de irradiação adotados.

Parâmetros de irradiação	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
Perfil do feixe	Multimodo
Área irradiada	3,14 cm ²
Irradiância no alvo	19 mW/cm ²
Tempo de exposição	300 s por ponto
Exposição radiante	5,7 J/cm ²
Técnica de aplicação	90° em relação à superfície, altura = 1,5 cm
Número total de sessões	6 por animal
Frequência das sessões	Dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21
Energia radiante total	18 J por sessão

5.3.2. Efeitos da fotobiomodulação nos depósitos de gordura

Vinte e quatro horas após a última sessão de PBM, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos cetamina e xilazina (300 e 60 mg/kg) administrados pela via intraperitoneal. Após confirmação da morte, amostras de diferentes compartimentos de tecido adiposo foram coletadas e suas massas aferidas para comparação entre os grupos. Da região abdominal, foram coletados os depósitos inguinais, (IGN), epididimais (EPI), mesentéricos (MES) e retroperitoneais (RP), e da região interescapular, o tecido adiposo marrom (TAM).

5.3.3. Efeitos da fotobiomodulação na inflamação do tecido adiposo branco

Para análise do infiltrado inflamatório no TAB, foram selecionadas amostras de tecido adiposo epididimal, que foram fixadas em formaldeído tamponado para inclusão em parafina e em lâminas silanizadas. Na preparação para imunofluorescência, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas em bateria de xilol e álcool, e pré-tratadas em banho-maria (30 min a 97°C) com tampão de citrato de sódio (10 mM Citrato de sódio, 0.05% Tween 20, pH 6,0) para recuperação antigênica. A seguir, as lâminas foram tratadas com anticorpos anti-F4/80 e anti-CD11b (BD Biosciences) já conjugados com fluoróforos para marcação de macrófagos e leucócitos totais, respectivamente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com DAPI para marcação do núcleo celular. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Leica, em aumento original de 200x. A preparação das lâminas e a aquisição das imagens foram realizadas nas dependências da Faculdade São Leopoldo Mandic, no Laboratório de Patologia, com o auxílio da Professora Dra. Elizabeth Ferreira Martinez.

Para quantificação das áreas e intensidades de fluorescência, utilizamos o software ImageJ¹⁰³ e protocolo descrito por McCloy e colaboradores¹⁰⁴. Brevemente, as imagens obtidas para cada canal de fluorescência foram convertidas em escala de cinza, e foram quantificadas as intensidades e áreas de fluorescência. Com o interesse de determinar se a PBM promoveu mudanças no perfil do infiltrado inflamatório do tecido adiposo analisado, foram calculadas as proporções de células F4/80⁺:CD11b⁺ tanto para porcentagem de área como para intensidade de fluorescência.

5.3.4. Análise estatística

Os dados de massa corporal e Índice de Lee ao longo do período de tratamento foram normalizados em relação aos valores iniciais dos animais (considerando como iniciais os valores obtidos antes do início da indução da SM). A partir das curvas glicêmicas obtidas nos TTG-IP foram calculadas áreas sob a curva. Os resultados foram analisados quanto à sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk, e os testes estatísticos adequados foram empregados para análise dos dados. Foram admitidas como significativas as comparações que apresentaram $p < 0,05$.

5.4. Resultados

5.4.1. Efeitos da fotobiomodulação na massa corporal, IL e TTG-IP

Durante o período de tratamento, os animais obesos (HF e HFABD850) mantiveram massas corporais significativamente maiores do que os animais eutróficos (ND) – **Figura 10**. Entre os primeiros (HF X HFABD850), no entanto, nenhuma diferença foi observada, indicando que a PBM não promoveu mudanças na massa corporal dos animais tratados em relação a seus controles *sham*-irradiados. O mesmo comportamento foi notado considerando o Índice de Lee (**Figura 11**).

Figura 10. Evolução da massa corporal normalizada em relação ao dia 0 de cada animal – antes do início da indução da obesidade –, durante o período de tratamento (médias $\pm$ EP). As chaves indicam diferença significativa entre os grupos HF:ND e HFABD85:ND, nos mesmos dias (two-way ANOVA com medidas repetidas e Bonferroni como pós-teste).

Figura 11. Evolução do índice de Lee normalizado em relação ao dia 0 de cada animal – antes do início da indução da obesidade –, durante o período de tratamento (médias $\pm$ EP). As chaves indicam diferença significativa entre os grupos HF:ND e HFABD85:ND, nos mesmos dias ($p<0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Observamos algumas variações na resposta ao TTG-IP durante o período de tratamento (**Figura 12**). As curvas glicêmicas dos grupos HF e HFABD850 apresentaram valores bastante próximos nos dias 2, 11 e 15 (24 h após a primeira, quarta e quinta sessões de irradiação, respectivamente). No dia 8 (24 h após a terceira sessão de tratamento), o grupo tratado (HFABD850) apresentou uma curva glicêmica com valores intermediários entre os grupos ND e HF. De fato, quando as áreas das curvas foram integradas (**Figura 13**), foi observada para esse grupo uma diferença significativa em relação aos valores obtidos imediatamente antes do início do tratamento (dia 8 *versus* semana 8). Essa diferença, no entanto, não foi observada quando o grupo tratado foi comparado com seu respectivo controle positivo (grupo HF). A única diferença significativa entre os grupos HF e HFABD850 foi observada na glicemia do tempo de 15 minutos do dia 22 (**Figura 12**), quando o grupo HF apresentou um valor médio de $525,5 \pm 22,4$ mg/dL enquanto que o grupo HFABD850 apresentou $458,7 \pm 17,5$ mg/dL.

Considerando as áreas abaixo das curvas glicêmicas calculadas ao longo do período de tratamento, a resposta ao teste de tolerância à glicose dos animais irradiados (HFABD850) permaneceu significativamente aumentada em relação aos animais do grupo ND em todos os tempos analisados. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos HF e HFABD850 (**Figura 13**).

Figura 12. Curvas glicêmicas obtidas durante o período de tratamento. Asteriscos indicam diferenças significativas entre o grupo ND *versus* HF e ND *versus* HFABD850; # representam significância estatística entre o grupo ND *versus* HF; \$ indicam diferenças significativas entre o grupo ND *versus* HFABD850; & representam diferenças significativas entre o grupo HF *versus* HFABD850. ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Figura 13. Evolução do teste de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva (AUC, médias $\pm$ EP) calculada para a curva glicêmica de cada animal, durante o período de tratamento. Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupos em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença

significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

5.4.2. Efeitos da fotobiomodulação nos depósitos de gordura

Como esperado, os principais depósitos de TAB intra-abdominais dos animais obesos (HF e HFABD850) mostraram-se significativamente maiores quando comparados aos seus controles eutróficos (**Figura 14** e **Figura 15**), mas sem diferenças estatísticas entre si. As massas dos depósitos inguinal e mesentérico apresentaram as maiores diferenças, sendo em torno de 4 vezes maiores do que as massas dos respectivos tecidos dos camundongos alimentados com dieta normal (ND). Para os depósitos epididimais e retroperitoneais, a dieta hiperlipídica promoveu um aumento de 2 vezes nas massas desses tecidos.

Figura 14. Diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta normal (ND), hiperlipídica (HF) ou obesos tratados com PBM na região interescapular (HFABD850). TAM: tecido adiposo marrom interescapular, ING: tecido adiposo branco inguinal, EPI: tecido adiposo branco epididimal, MES: tecido adiposo branco mesentérico, RP: tecido adiposo branco retro-peritoneal. Note a diferença nas dimensões dos TABs dos animais eutróficos (ND) e obesos (HF e HFABD850).

Figura 15. Comparação das massas do tecido adiposo de diferentes compartimentos (médias $\pm$ EP). TAM: tecido adiposo marrom interescapular; EPI: tecido adiposo branco epididimal; ING: tecido adiposo branco inguinal; MES: tecido adiposo branco mesentérico; REP: tecido adiposo branco retroperitoneal. ($p < 0,05$; one-way ANOVA com medidas repetidas, e Tukey como pós-teste).

5.4.3. Efeitos da fotobiomodulação na inflamação do tecido adiposo branco

Como pode ser observado na **Figura 16** e **Figura 17**, o TAB de camundongos obesos (HF) apresentou densidade de células $CD11b^+$ e $F4/80^+$ aproximadamente duas vezes maior do que os camundongos tratados (HFABD850). Essa magnitude também foi observada quanto à intensidade de fluorescência para os dois tipos celulares (**Figura 17**). A proporção de células $F4/80^+ : CD11b^+$ foi semelhante nos dois grupos (**Figura 18**), indicando que a população de leucócitos presente no tecido adiposo dos animais é predominantemente formada por macrófagos em ambos os grupos estudados.

Figura 16. Tratamento com PBM na região abdominal promoveu redução na quantidade de leucócitos no tecido adiposo de camundongos com SM. Os espaços vazios representam as áreas ocupadas por adipócitos. Marcação por imunofluorescência de leucócitos (CD11b, verde) e macrófagos (F4/80, vermelho). Núcleos foram marcados com DAPI (azul). O quarto painel indica que a população de leucócitos no tecido adiposo é predominantemente composta por macrófagos.

Figura 17. Intensidade de fluorescência e porcentagem de área ocupada por células CD11b⁺ e F4/80⁺. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. Comparação por Teste t.

Figura 18. Proporção de células F4/80⁺:CD11b⁺, considerando porcentagem de área e intensidade de fluorescência. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão. Comparação por Teste t.

5.5. Discussão

Após seis sessões de irradiação na região abdominal, não foram observados efeitos do tratamento na massa corporal e no Índice de Lee (**Figura 10** e **Figura 11**). Tanto os animais do grupo HF como os animais do grupo HFABD850 mantiveram esses parâmetros significativamente maiores em comparação com os animais eutróficos (ND) até o último dia de avaliação. Quando analisamos as respostas glicêmicas ao TTG-IP (**Figura 13**), notamos que ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram valores significativamente menores no dia 22 em relação aos seus valores iniciais (dia 0). Uma vez que essa observação foi comum a ambos os grupos, podemos supor que tal redução foi resultado de condições experimentais particulares desse dia. No entanto, é importante destacar que somente o grupo HFABD850 mostrou uma redução significativa nos valores de AUC no dia 8, 24 h após a terceira sessão de irradiação, em

comparação com seus valores iniciais (dia 0). Ao analisarmos as curvas glicêmicas desse dia (**Figura 12**, dia 8), notamos que os animais do grupo tratado apresentaram valores de glicemia menores do que os do grupo HF em três dos seis tempos avaliados (15, 30 e 60 min), e somente no tempo de 60 minutos esses valores foram significativamente diferentes do que os observados para o grupo ND.

Quando comparamos nossos resultados das respostas glicêmicas ao TTG-IP após as irradiações na região abdominal dos animais com o que fora previamente descrito na literatura pelo grupo de Silva e colaboradores³⁸, notamos algumas diferenças nos achados. Os autores observaram reduções significativas na área abaixo da curva calculadas para as curvas glicêmicas de camundongos obesos da linhagem Swiss após protocolo de irradiação utilizando um laser de emissão na região do infravermelho próximo (780 nm), quando comparados aos seus respectivos controles sham-irradiados.

O tratamento proposto pelo grupo consistiu em cinco sessões de irradiação consecutivas repetidas durante quatro semanas, iniciadas após um período de oito semanas de indução do quadro de obesidade com dieta hiperlipídica. Em cada sessão terapêutica, cinco pontos anatômicos foram irradiados (além da região abdominal, também foram alvos os tecidos musculares das regiões anteriores e posteriores da coxa), sendo entregue um total de 2 J de energia por sessão. No nosso trabalho, seis sessões de irradiação foram distribuídas ao longo de três semanas, em uma frequência bastante menor quando comparada ao protocolo de Silva e colaboradores. Dessa forma, sugerimos que sejam necessárias mais sessões de irradiação somente na região abdominal para que os efeitos do tratamento na resposta glicêmica se mostrem significativos. Além do número de sessões, a irradiação de outros pontos anatômicos também parece ser uma estratégia interessante para o tratamento adjuvante da SM com o uso da PBM.

Ainda sobre o trabalho de Silva e colaboradores³⁸, os autores avaliaram a massa de diferentes depósitos adiposos após a eutanásia dos animais, que foi realizada 48 h após a última sessão de irradiação. Foi observada uma redução significativa na massa dos tecidos dos compartimentos epididimal e mesentérico dos animais obesos tratados em comparação com seus controles positivos (camundongos obesos sham-irradiados). No presente estudo, observamos uma redução na massa do tecido adiposo inguinal (**Figura 15**), que talvez pudesse ter se mostrado estatisticamente significativa se o número de animais por grupo tivesse sido maior. Para os outros depósitos intra-

abdominais de tecido adiposo branco (epididimal, mesentérico e retroperitoneal), as massas aferidas para os grupos HF e HFABD850 se mostraram bastante semelhantes.

Nossos achados mais interessantes da PBM aplicada à região abdominal de camundongos com SM foram observados nas imunofluorescências do tecido adiposo epididimal (**Figura 16**). Nos animais tratados, os leucócitos (células CD11b⁺) ocuparam $13,7 \pm 5,8$ % da área desse tecido, ao passo que nos camundongos sham-irradiados essas células representaram $33,75 \pm 7,68$ % da área. Essa redução significativa na presença de leucócitos também foi observada para os macrófagos após as seis sessões de tratamento. Considerando que a presença aumentada de células inflamatórias no tecido adiposo intra-abdominal no quadro de obesidade está relacionada com um perfil de ativação pró-inflamatório dessas células, e que essa inflamação tecidual contribui para o desenvolvimento de intolerância à glicose^{11,12,19}, podemos inferir que nosso protocolo de tratamento promoveu uma redução nesse quadro inflamatório e que essa redução pode ser benéfica no prognóstico da obesidade e de suas morbidades associadas. Ainda que não tenham sido observados efeitos proeminentes do tratamento na resposta ao TTG-IP de animais com SM, é importante lembrar que o estímulo à progressão dessa inflamação, isto é, a dieta hiperlipídica, permaneceu constante durante todo o protocolo terapêutico e, mesmo assim, os efeitos das irradiações foram suficientes para impedir o avanço do quadro inflamatório. Esses achados nos encorajam a afirmar que o tratamento com PBM para SM é de fato uma estratégia que deve continuar a ser investigada, e seus benefícios podem ser ainda maiores do que os aqui relatados.

6. FOTOBIMODULAÇÃO APLICADA AO TECIDO ADIPOSEO MARROM

6.1. Background

Enquanto o TAB tem como função primária o armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis, o tecido adiposo marrom (TAM) é reconhecido por ser um órgão que consome energia para produzir calor. A termogênese do TAM é um mecanismo essencial para a sobrevivência de pequenos mamíferos que vivem em ambientes muito frios, e também durante períodos de hibernação¹⁰⁵. Essa produção de calor é possível graças à presença de UCP1 na membrana interna mitocondrial associada às ATP (trifosfato de adenosina) sintases dos adipócitos marrons, que, ao invés de produzirem ATP através da fosforilação de ADP (adenosina bifosfato) utilizando a força eletromotriz do influxo de prótons, dissipam essa energia na forma de calor^{39,40,106}.

O interesse no estudo desse tecido vem crescendo nas últimas décadas, uma vez que são recentes as descobertas da sua influência metabólica na obesidade. Em 1993, por exemplo, o grupo de Lowell¹⁰⁷ demonstrou, através de um modelo transgênico de ablação do TAM em camundongos, que o hipodesenvolvimento desse tecido levou ao estabelecimento de um quadro de obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose e hiperlipidemia nos animais, de maneira muito semelhante ao que fora observado em outros modelos genéticos de indução da obesidade, como as linhagens ob/ob e db/db.

Até 2009, acreditava-se que o TAM era encontrado nos seres humanos exclusivamente na fase recém-nascida, estando ausente em adultos⁴¹. Uma série de estudos publicados no periódico *The New England Journal of Medicine*⁴²⁻⁴⁴, no entanto, mostrou através de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-CT) a presença desse tecido em indivíduos adultos, abrindo um novo ramo de pesquisa para o tratamento da obesidade e de suas morbidades associadas, uma vez que a ativação do TAM aumentaria de forma relevante o gasto energético basal por meio da oxidação de cadeias carbônicas originadas principalmente das gorduras e dos carboidratos, consumindo essas fontes de energia para a geração de calor. Os autores desses estudos observaram que os depósitos de TAM nos seres humanos estão principalmente

localizados nas regiões cervical, supraclavicular, plexo braquial e paravertebral, como pode ser observado na **Figura 19**.

Figura 19. Localização anatômica de depósitos de tecido adiposo marrom em um ser humano adulto, em condições de exposição ao frio (A) e termoneutralidade (B). Imagens obtidas por PET-CT, após administração de ^{18}F -FDG. Imagem adaptada de van Marken Lichtenbelt e colaboradores⁴⁴.

van Marken Lichtenbelt e colaboradores⁴⁴ expuseram indivíduos adultos com diversas composições corporais ao frio, e observaram através de imagens de PET-CT uma captação 4 vezes menor do radioisótopo fluodesoxiglicose (^{18}F -FDG) pelo TAM de sujeitos com sobrepeso ou obesidade, quando comparados com os indivíduos eutróficos (**Figura 20**). Quando ativado, o TAM aumenta consideravelmente a captação de glicose, e a captação diminuída de ^{18}F -FDG por indivíduos obesos indica que esse tecido se encontra hiporresponsivo a estímulos clássicos para sua ativação, como o é a exposição ao frio. Essa observação, portanto, estimula o desenvolvimento de estratégias direcionadas a promover o aumento da atividade metabólica desse tecido em obesos, como tratamento adjuvante da obesidade. Considerando que um dos possíveis mecanismos de ação da PBM ocorre via absorção da radiação eletromagnética por complexos da cadeia transportadora de elétrons – resultando em aumento do metabolismo mitocondrial e da síntese de ATP^{72,73,108} –, é possível inferir que o tratamento com luz de baixa potência pode promover, de forma não invasiva, o aumento da atividade mitocondrial do TAM. Dessa forma, a fotobiomodulação poderia ser considerada como uma ferramenta capaz de melhorar a funcionalidade do TAM, que se encontra prejudicada na condição de obesidade e síndrome metabólica.

Figura 20. Imagens de PET-CT obtidas de seres humanos adultos após administração de ^{18}F -FDG e exposição ao frio. Note a maior captação do radioisótopo pelo TAM de indivíduos eutróficos (A e B), em comparação com sujeitos obesos (C). Adaptado de van Marken Lichtenbelt e colaboradores⁴⁴.

6.2. Metodologia

6.2.1. Funcionalidade do TAM

6.2.1.1. Imageamento termográfico

A funcionalidade do TAM foi avaliada com auxílio da técnica de imageamento por câmera termográfica^{109,110}. De maneira não invasiva, foi possível acompanhar a resposta do TAM de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica através das variações da temperatura corporal dos animais antes e depois de serem expostos ao frio (durante 1 h, a 10°C), uma vez que baixas temperaturas são uma das formas de promover aumento da atividade do TAM¹¹¹⁻¹¹³. Para padronizar as aquisições de imagem, foi colocada uma máscara de acetato com uma janela de 2 x 1 cm sobre a região interescapular previamente depilada dos animais, de forma que a mesma área pudesse ser fotografada em condição de termoneutralidade e após exposição ao frio (**Figura 21**). Para a captura

das imagens, foi utilizada a câmera Thermacam SC 3000 (FLIR System, EUA), gentilmente fornecida pela Professora Dra. Denise Maria Zezell, do Laboratório de Biofotônica do CLA-IPEN. Durante o imageamento, os animais permaneceram sedados com auxílio de anestesia ventilatória para adequado posicionamento sob a câmera, e as imagens foram coletadas a uma distância padronizada de 10 cm. Para diminuir as possíveis interferências da temperatura externa à câmera, a temperatura ambiente foi controlada e mantida a 19°C. As imagens foram analisadas através do software ThermoCAM Researcher Pro 2.10 (FLIR Thermal Imaging), onde as médias de temperatura nas regiões de interesse foram calculadas. Para comparação entre os grupos, foi calculada a diferença entre as temperaturas após e antes da exposição ao frio.

Figura 21. Imagens termográficas de animais alimentados com dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HF), imediatamente antes a após exposição ao frio. Note que após a exposição ao frio houve um aumento de 1,5°C na temperatura máxima do animal ND, enquanto que para o animal HF não foi observado aumento de temperatura.

6.2.1.2. Microtomografia por emissão de pósitrons

Outra técnica usada para avaliação da funcionalidade do TAM foi a tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (microPET-CT). Nos dias das aquisições das imagens, os animais receberam entre 60 e 100 µL de

fluodesoxiglicose (^{18}F -FDG) por de injeção da veia caudal, totalizando atividades radioativas entre 100 e 200 μCi . As seringas com as soluções de ^{18}F -FDG tiveram suas atividades aferidas em radiômetro calibrado antes e após as administrações, para que o conteúdo restante pudesse ser descontado da atividade inicial. Depois de realizadas as injeções, os animais foram expostos ao frio (entre 14 e 16°C) durante o período de biodistribuição (45 min) do radionuclídeo, e posteriormente colocados no equipamento Albira microPET-CT (Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP).

Foram obtidas imagens de animais eutróficos (ND) e obesos (HF), dois dias antes e imediatamente após uma única sessão de PBM. Os animais irradiados foram preparados da mesma forma descrita anteriormente (volume, atividade e via de administração do ^{18}F -FDG), com a diferença de que as irradiações ocorreram 15 min depois da administração do radiofármaco e do início da exposição ao frio. Passado esse período, os animais foram colocados sob anestesia ventilatória e expostos à irradiação da região interescapular durante 300 s, com um LED de emissão vermelha (660 nm), nos parâmetros descritos anteriormente (**Tabela 9**). Em seguida, voltaram para a câmara resfriada, onde permaneceram por mais 25 min, totalizando os 45 min do tempo necessário para a biodistribuição do radiofármaco e aquisição das imagens.

As imagens foram processadas por meio do software amide.exe 1.0.4 (Andreas Loening), que permite ajustar as escalas de intensidade pela atividade radioativa que foi administrada aos animais.

6.2.2. Fotobiomodulação aplicada ao tecido adiposo marrom

Uma vez que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram diferenças significativas na massa corporal, índice de Lee, resposta ao TTG-IP e na temperatura da região interescapular, foi dado início ao protocolo de tratamento. Selecionamos como alvo das irradiações o TAM localizado na região subcutânea interescapular, e comprimento de onda na região do vermelho (660 nm). Dessa forma, os animais foram distribuídos nos grupos apresentados na **Tabela 8**:

Tabela 8. Descrição dos grupos experimentais.

Grupos	n	Alvo	Comprimento de onda (nm)
ND	7	-----	-----
HF	7	-----	-----
HFTAM660	7	Interescapular	660

Os animais foram irradiados por via transcutânea sobre a superfície interescapular previamente depilada. Os parâmetros de irradiação e as especificações do LED (do inglês *light-emitting diode*) utilizado encontram-se na **Tabela 9**. As irradiações foram realizadas nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21, seguindo um protocolo previamente desenvolvido pelo nosso grupo ³⁷. Animais não irradiados (ND e HF) foram manejados da mesma forma, no entanto, permaneceram sob o equipamento LED desligado durante as sessões de tratamento. Os animais dos grupos HF e HFTAM660 continuaram a receber a dieta modificada durante todo o período das irradiações

Tabela 9. Características dos dispositivos LED e os parâmetros de irradiação a serem adotados.

Parâmetros de irradiação	660 nm
Pico de emissão	662 nm
Largura espectral FWHM	20 nm
Modo de operação	Onda contínua
Potência radiante média	38 mW
Polarização	Randômica
Perfil do feixe	Multimodo
Área irradiada	2 cm ²
Irradiância no alvo	19 mW/cm ²
Tempo de exposição	300 s por ponto
Exposição radiante	5,7 J/cm ²
Técnica de aplicação	90° em relação à superfície, altura = 1,5 cm
Número total de sessões	6 por animal
Frequência das sessões	Dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21
Energia radiante total	11,4 J por sessão

Foi necessário que as regiões irradiadas estivessem livres de pelos para evitar o espalhamento e otimizar a entrega da luz. Para tanto, na véspera das sessões de PBM (e também nos dias de imageamento termográfico), os animais foram sedados com auxílio de anestesia ventilatória, para tricotomia e depilação com creme à base de tioglicolato (Veet®, Reckitt Benckiser). Durante as irradiações, eles também permaneceram sedados com o mesmo sistema de anestesia inalatória.

6.2.3. Efeitos da fotobiomodulação no soro

No dia 22 (24 h após a última sessão de irradiação), os animais foram colocados sob anestesia profunda através de injeção intraperitoneal de quetamina e xilazina (300 mg/kg e 60 mg/kg de massa corporal), e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. O soro sanguíneo foi separado por coagulação seguida de centrifugação a 1.500 g durante 15 min a 4 °C¹¹⁴. Após separação, o soro foi congelado e

armazenado a -26 °C para análise por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR). No dia das análises, as amostras foram descongeladas sob refrigeração, homogeneizadas em vórtex e alíquotas de 5 µL foram dispostas sobre uma lâmina de vidro recoberta com papel alumínio, seguindo metodologia descrita por Cui e colaboradores¹¹⁵. As gotas de soro secaram em estufa a 37 °C durante 30 min, e as amostras foram analisadas no equipamento Frontier™ NIR (PerkinElmer Inc.) da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os espectros obtidos para animais ND, HF e HFTAM660 foram comparados pós prévia normalização.

6.2.4. Efeitos da fotobiomodulação nos depósitos de gordura

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por sobredose de quetamina e xilazina (300 mg/kg e 60 mg/kg de massa corporal). Após confirmação da morte, amostras de diferentes compartimentos de tecido adiposo foram coletadas e suas massas aferidas para comparação entre os grupos. Da região abdominal, foram coletados os depósitos inguinais, (IGN), epididimais (EPI), mesentéricos (MES) e retroperitoneais (RP), e da região interescapular, o tecido adiposo marrom (TAM).

6.2.5. Efeitos da fotobiomodulação na expressão de UCP-1

Com o intuito de verificarmos se a PBM promoveu efeitos sobre a expressão de UCP1 no TAM dos camundongos irradiados, prosseguimos com a técnica de Western Blot. Após a eutanásia dos animais, amostras de TAM interescapular foram coletadas, pesadas, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Posteriormente, esses tecidos foram descongelados e homogeneizados em tampão de lise (RIPA, EDTA 1 mM, coquetel inibidor de protease, NaNOV₄ 1nM, NaF 1 mM) com auxílio de sonificador ultrassônico em 3 ciclos de 30 s. O lisado celular foi centrifugado a 14.000 g durante 15 min, a 4 °C. A gordura foi descartada, e o sobrenadante utilizado para as análises.

As amostras de proteínas foram quantificadas pela técnica BCA-Pierce e 50 µg de proteína foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS 12% por eletroforese no Sistema BioRad. Após migração, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário para UCP1 (Cell Signaling Technology) e Erk 42/44 (Cell Signaling Technology), e em seguida tratadas com anticorpo secundário específico anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Imuny-VBP Biotecnologia) por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram tratadas com o

kit de quimioluminescência (Thermo Fisher Scientific) e então reveladas em sistema ChemiDoc (BioRad), utilizando software ImageLab (BioRad). A quantificação das intensidades de luminescência foi realizada com auxílio da ferramenta de análise de gel do software ImageJ¹⁰³. Após subtração de background e ajuste de brilho e contraste, a densidade óptica de UCP1 foi calculada em relação às intensidades obtidas para a proteína Erk 42/44.

6.2.6. Análise estatística

Os dados de massa corporal e Índice de Lee ao longo do período de tratamento foram normalizados em relação aos valores iniciais dos animais (considerando como iniciais os valores obtidos antes do início da indução da SM). A partir das curvas glicêmicas obtidas nos TTG-IP foram calculadas áreas sob a curva. Os resultados foram analisados quanto à sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk, e os testes estatísticos adequados foram empregados para análise dos dados. Para ATR-FTIR, foi empregada a análise hierárquica de clusters (HCA) das médias normalizadas dos espectros obtidos para cada grupo. Foram admitidas como significativas as comparações que apresentaram $p < 0,05$.

6.3. Resultados

6.3.1. Modelo animal de síndrome metabólica

O período de indução da SM foi mais prolongado para os animais irradiados na região do TAM interescapular, uma vez que foi necessário aguardar que a resposta termogênica desse tecido ao estímulo de frio apresentasse diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles eutróficos. Esse fenômeno só foi constatado após 15 semanas, quando camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menores temperaturas nessa região após exposição ao frio (**Figura 22**), indicando que a funcionalidade do TAM desses animais se encontrava diminuída no quadro de SM.

Figura 22. Diferença na temperatura da região interescapular de camundongos alimentados com dieta normal (ND) e dieta hiperlipídica (HF). ΔT = temperatura média após exposição ao frio - temperatura média antes da exposição ao frio. Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Como podemos observar na **Figura 23**, após 15 semanas com a dieta hiperlipídica, os animais do grupo HF apresentaram Índice de Lee e massa corporal significativamente maiores quando comparados aos animais do grupo controle (ND). Ao final do período de indução, animais do grupo HF mostraram um aumento de aproximadamente 50% de massa corpórea e 40% de aumento do índice de Lee.

Figura 23. Evolução da massa corporal (A) e Índice de Lee (B) normalizados em relação à semana 0 de cada animal (médias $\pm$ erro padrão (EP)). Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Na décima quinta semana, os animais HF também apresentaram resposta alterada ao TTG-IP, como ilustrado nas **Figura 24** e **Figura 25**.

Figura 24. Resposta ao teste de tolerância à glicose intra-peritoneal antes e após 15 semanas de indução do modelo de síndrome metabólica. Os animais do grupo HF apresentaram níveis glicêmicos aumentados em todos os tempos avaliados (exceção para o tempo 0), quando comparados aos animais eutróficos (ND) ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

Figura 25. Evolução dos testes de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva (AUC, médias $\pm$ EP) calculada para a curva glicêmica de cada animal (**Figura 24**). Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

6.3.2. Efeitos da fotobiomodulação na massa corporal, Índice de Lee e tolerância à glicose

Ao longo do período de tratamento, os animais obesos (HF e HFTAM660) mantiveram massas corporais significativamente maiores do que os animais eutróficos (ND) – **Figura 26**. Entre os primeiros (HF X HFTAM660), no entanto, nenhuma diferença foi observada, indicando que a PBM não promoveu mudanças na massa corporal dos animais tratados em relação a seus controles *sham*-irradiados. Quando analisamos o comportamento da massa corporal dentro de cada grupo, os animais alimentados com

dieta normal mantiveram valores constantes, enquanto algumas diferenças foram detectadas para os animais obesos. Considerando o grupo HFTAM660, houve uma redução de massa de aproximadamente 4% que se manteve até o fim do período experimental. Já no grupo HF, foi observada redução de 7%. Entre os grupos HF e HFTAM660, no entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ao fim do tratamento.

Figura 26. Evolução da massa corporal normalizada em relação ao dia 0 de cada animal – antes do início da indução da obesidade durante o período experimental (médias $\pm$ EP). Letras indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes e as chaves indicam diferença significativa entre os grupos (two-way ANOVA com medidas repetidas e Bonferroni como pós-teste).

Esse comportamento de redução da massa corporal dos animais obesos também foi notado considerando o Índice de Lee. O grupo ND manteve o IL constante durante todo o período experimental. Os grupos HF, entretanto, ao final do período de tratamento (dia 22), apresentaram diminuição de 6% em relação aos ILs observados antes do início das intervenções (**Figura 27**). Os camundongos HF irradiados apresentaram uma redução média de 3% no IL.

Figura 27. Evolução do índice de Lee normalizado em relação ao dia 0 de cada animal – antes do início da indução da obesidade –, durante o período de tratamento (médias $\pm$ EP). Letras indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e as chaves indicam diferença significativa entre os grupos nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

A resposta ao teste de tolerância à glicose dos animais irradiados (HFTAM660) permaneceu aumentada em relação aos animais do grupo ND durante todo o período experimental, mas não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo HF (Figura 28).

Figura 28. Evolução do teste de tolerância à glicose, representados pela Área Abaixo da Curva (AUC, médias $\pm$ EP) calculada para a curva glicêmica de cada animal, durante o período de tratamento. Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

6.3.3. Efeitos da fotobiomodulação nos depósitos de gordura

Como esperado, os principais depósitos de TAB intra-abdominais dos animais obesos mostraram-se significativamente maiores quando comparados aos seus controles eutróficos (**Figura 29** e **Figura 30**), mas sem diferenças estatísticas entre si. As massas dos depósitos epididimal, inguinal e retroperitoneal apresentaram as maiores diferenças, sendo em torno de 5 vezes maiores do que as massas dos respectivos tecidos dos camundongos alimentados com dieta normal (ND). Um achado interessante foi observado em relação ao TAM: enquanto não foi verificada diferença significativa entre os grupos ND e HF, nos camundongos do grupo HFTAM660 esse tecido apresentou uma média de massa duas vezes maior em relação aos outros grupos (ND: 190 mg; HF: 174 mg e HFTAM660 366 mg).

Figura 29. Diferentes depósitos de tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta normal (ND), hiperlipídica (HF) ou obesos tratados com PBM na região interescapular (HFTAM660). TAM: tecido adiposo marrom interescapular, ING: tecido adiposo branco inguinal, EPI: tecido adiposo branco epididimal, MES: tecido adiposo branco mesentérico, RP: tecido adiposo branco retro-peritoneal. Note a diferença nas dimensões dos TABs dos animais eutróficos (ND) e obesos (HF e HFTAM660) e as diferenças entre as dimensões dos TAMs entre ND, HF e HFTAM660.

Figura 30. Comparação das massas do tecido adiposo de diferentes compartimentos (médias $\pm$ EP). TAM: tecido adiposo marrom interescapular; EPI: tecido adiposo branco epididimal; ING: tecido adiposo branco inguinal; MES: tecido adiposo branco mesentérico; REP: tecido adiposo branco retroperitoneal. ($p < 0,05$: TAM, REP: teste de Kruskal-Wallis, Dunn's como pós teste; EPI, ING, MES: one-way ANOVA com medidas repetidas, e Tukey como pós-teste).

6.3.4. Efeitos da fotobiomodulação no soro

Com relação às alterações plasmáticas promovidas pela PBM no TAM, as absorções lipídicas foram responsáveis pelas diferenças mais evidentes entre os espectros. Uma intensa absorção do estiramento C = O em 1742 cm^{-1} foi observada apenas para o grupo HF. As absorções dos estiramentos simétrico e antissimétrico dos grupos alquil CH_2 em 2853 e 2925 cm^{-1} , respectivamente, também foram mais pronunciadas no grupo HF (**Figura 31**). Subtraindo os espectros, observa-se que animais HF aumentam os modos vibracionais referentes a lipídios¹¹⁶, no entanto, após a PBM, esses modos vibracionais foram degradados (**Figura 32**).

Figura 31. Absorbância do soro de camundongos ND, HF e HFTAM660. Os picos mostrados referem-se a modos vibracionais de lipídios.

Figura 32. Diferença de absorvância entre os grupos HF e ND e HFTAM660 e HF. Observa-se formação de picos após indução da síndrome metabólica e degradação desses picos referentes a lipídios após PBM.

Para a análise hierárquica de *clusters* (HCA), primeiramente agrupamos os grupos considerando toda a região espectral ($540 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, **Figura 33**). Observa-se que os grupos ND e HFTAM660 foram agrupados em um mesmo *cluster*, indicando maior homogeneidade entre eles.

Figura 33. Dendrograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando toda a região espectral.

Para uma análise de analitos do soro, consideramos as regiões espectrais especificadas na **Tabela 10**^{117,118}. Independente da região analisada, a HCA identificou semelhanças entre os espectros, e os grupos ND e HFTAM660 foram sempre agrupados em um mesmo *cluster* (**Figura 34** e **Figura 35**).

Tabela 10. Analitos de interesse e respectivas regiões espectrais^{117,118}. HDL: *high density liproteins*, lipoproteínas de alta densidade; LDL: *low density lipoptroteins*, lipoproteínas de baixa densidade.

Analito	Região espectral (cm-1)
Glicose	925 – 1250
Colesterol HDL	900–1500, 1700–1800, 2800–3500
Colesterol LDL	1700–1800, 2800–3000
Colesterol	1100-1300, 1700–1800, 2800–3000
Triglicerídeos	2800–3200
Proteínas totais	900 - 1800

Figura 34. Dendrograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando as regiões espectrais da glicose (A), proteínas totais (B) e triglicerídeos (C).

Figura 35. Dendrograma obtido após HCA dos grupos ND, HF e HFTAM660 considerando as regiões espectrais do colesterol HDL (A, B e D), colesterol LDL (D e E) e colesterol (C, D e E).

6.3.5. Efeitos da fotobiomodulação na funcionalidade do tecido adiposo marrom

Em relação à resposta da temperatura dos animais da região do TAM interescapular após exposição ao frio, observamos que os animais do grupo ND e HF mantiveram sua temperatura praticamente constante ao longo do período experimental. Apesar do dia 15 mostrar uma diminuição significativa na temperatura para o grupo ND, acreditamos que isso possa ter ocorrido por um artefato de técnica, uma vez que essa queda foi observada para todos os grupos. Interessantemente, a partir da terceira sessão de irradiação (dia 8) os animais do grupo HFTAM660 apresentaram aumento significativo da temperatura em relação ao dia 0 (**Figura 36**).

Figura 36. Diferença na temperatura da região interescapular de camundongos alimentados com dieta normal (ND), dieta hiperlipídica (HF) e irradiados na região interescapular (HFTAM660), durante o período de tratamento, medidas por imageamento termográfico 24 h após as sessões de irradiação. ΔT = temperatura média após exposição ao frio - temperatura média antes da exposição ao frio. Letras minúsculas indicam diferença significativa intragrupo em dias diferentes, e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os grupos, nos mesmos dias ($p < 0,05$, two-way ANOVA com medidas repetidas, e Bonferroni como pós-teste).

O ensaio que realizamos com a técnica de microPET-CT mostrou que o TAM de animais obesos apresentou menor captação de ^{18}F -FDG após estímulo por frio quando comparados aos animais eutróficos (**Figura 37**). Após uma única sessão de PBM, essa captação foi aumentada somente para animais HF, como pode ser observado na mesma figura.

Figura 37. Microtomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta normal (ND) ou hiperlipídica (HF), dois dias antes e imediatamente após uma sessão de PBM. A intensidade do sinal emitido foi normalizada segundo a atividade do radiofármaco administrada nos diferentes dias. É possível notar maior atividade do TAM (região interescapular) do animal HF imediatamente após a irradiação, como apontam as setas.

Apesar de terem sido encontradas diferenças significativas em relação à massa do TAM dos animais irradiados (HFTAM660), o mesmo não ocorreu para a expressão de UCP1, embora o grupo HFTAM660 tenha apresentado uma densidade relativa de UCP-1 maior que o grupo HF, mas que não se mostrou significativa (**Figura 38**).

Figura 38. Blot representativo (A) e densidades relativas (B) de UCP1 e Erk 42/44, extraídas de TAM de camundongos obesos (HF) e irradiados na região interescapular (HFTAM660), $p>0,05$, Teste t.

6.4. Discussão

A princípio, os animais do grupo HFTAM660 também iniciariam as sessões de irradiação no mesmo momento que o grupo HFABD850, ou seja, a partir da oitava semana de indução da SM. No entanto, só foi possível observar diferenças significativas na resposta do TAM ao estímulo do frio a partir da décima quinta semana. Essas diferenças foram confirmadas pela menor temperatura na região interescapular e menor captação de ^{18}F -FDG pelo TAM (**Figura 22** e **Figura 37**). Dessa forma, para avaliarmos os efeitos da PBM nesse tecido, era de extrema importância que fosse possível realizar um diagnóstico de sua funcionalidade através dos métodos que tínhamos disponíveis. Após esse período, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram incremento de $0,2^{\circ}\text{C}$ na temperatura da região interescapular após permanecerem por 1 h a 10°C , enquanto que nos animais eutróficos, esse aumento foi de $1,5^{\circ}\text{C}$, concordando com relatos prévios na literatura⁴²⁻⁴⁴.

Ao longo do protocolo de tratamento, os camundongos do grupo ND mantiveram constante esse aumento na temperatura da região dorsal (**Figura 36**). Já nos animais dos grupos HF e HFTAM660, um aumento progressivo foi observado: a partir do dia 4 para o grupo HF e do dia 2 para o grupo HFTAM660 as temperaturas não foram mais consideradas significativamente diferentes do grupo ND. De fato, sabe-se que a exposição constante a baixas temperaturas pode levar à ativação do TAM, e a crioterapia têm sido proposta para o tratamento da obesidade^{119,120}. Nesse sentido, é possível supor que o aumento de temperatura observado tenha sido em decorrência de exposições consecutivas dos animais ao frio. Ainda assim, somente os animais irradiados apresentaram temperaturas significativamente maiores em relação aos seus valores iniciais (dias 8, 11 e 22), indicando que a PBM tenha agido de forma sinérgica com os possíveis efeitos provocados pelas baixas temperaturas. Stanford e colaboradores¹²¹ demonstraram que, após receberem transplante heterotópico de 100 mg ou 400 mg de TAM, camundongos obesos da linhagem C57BL/6 apresentaram melhora na tolerância à glicose e na sensibilidade à ação da insulina, e diminuição na velocidade do ganho de massa corporal mesmo quando continuamente alimentados com dieta hiperlipídica. Interessante observar que esses resultados somente foram observados passadas 8 semanas da realização dos transplantes, e apresentaram um comportamento de dose-resposta: quanto maior a massa de tecido transplantado, mais pronunciados foram seus

efeitos. Considerando que as irradiações com LED de emissão vermelha na região interescapular promoveram um aumento significativo na massa do TAM dos animais do grupo HFTAM660 (**Figura 30**), e que esse aumento foi da ordem de 192 mg, podemos supor que não foram observados os mesmos efeitos nas respostas glicêmicas e na massa corporal dos animais tratados devido à interrupção do acompanhamento desses camundongos após as três semanas de tratamento. Esse aumento da massa do TAM promovido pela PBM não foi acompanhado de aumento significativo na quantidade de UCP1 nesse tecido. Apesar dos animais tratados (HFTAM660) apresentarem maior densidade relativa dessa proteína (**Figura 38, B**), essa diferença não foi considerada significativa em relação aos animais obesos não tratados (71.694 ± 11.779 *versus* 59.811 ± 23.817 , $p=0,3262$). Essa falta de significância estatística pode ter ocorrido pelos altos desvios padrão obtidos, que, por sua vez, poderiam ser diminuídos caso o número de animais por grupo fosse maior.

Apesar de ainda serem controversos os efeitos sistêmicos decorrentes de irradiações localizadas⁷¹, o tratamento com LED de emissão vermelha na região interescapular de camundongos com SM parece ter promovido mudanças no soro desses animais. Com a técnica de ATR-FTIR foi possível identificar alterações plasmáticas promovidas pela dieta hiperlipídica, observadas através do aumento nos modos vibracionais nas regiões características de lipídios (1742 cm^{-1} e entre 2800 e 3000 cm^{-1} , **Figura 31** e **Figura 32**). Tais modos vibracionais foram associados com as regiões espectrais de colesterol HDL, LDL e triglicerídeos^{117,118}, indicando que a dieta hiperlipídica provocou aumento na concentração desses analitos nos animais do grupo HF. Após as sessões de tratamento, foram observadas degradações nesses mesmos modos vibracionais nos camundongos do grupo HFTAM660, e, quando comparados aos demais grupos pela análise hierárquica de clusters, o soro dos animais tratados se mostrou mais similar ao soro dos animais eutróficos em todas as regiões espectrais analisadas, que incluíram, além dos lipídeos, também a glicose (**Figura 34** e **Figura 35**). A técnica de ATR-FTIR foi, portanto, sensível o bastante para detectar essas alterações, e se mostra como uma ferramenta complementar interessante às técnicas convencionais de quantificação plasmática por kits colorimétricos.

7. CONCLUSÕES

Com base nas informações apresentadas, podemos concluir que o modelo de SM foi induzido com sucesso em camundongos da linhagem C57BL/6 através da administração de dieta hiperlipídica. A SM foi validada após 8 semanas, quando os animais apresentaram aumento significativo de massa corporal, Índice de Lee e intolerância à glicose. Após 15 semanas, os animais obesos também apresentaram hiporesponsividade do TAM ao estímulo de frio, diagnosticada através de menor captação de ^{18}F -FDG e temperaturas mais baixas na região interescapular.

Apesar de não terem promovido efeitos na massa corpora, Índice de Lee e tolerância à glicose, as irradiações na região do TAM promoveram alterações bioquímicas no soro dos camundongos tratados, observadas através da degradação de modos vibracionais relacionados a bandas de absorção de lipídios. O soro desses animais apresentou maior similaridade com animais eutróficos.

Considerando ainda as irradiações com LED 660 nm na região dorsal, uma única sessão de tratamento promoveu aumento na captação de ^{18}F -FDG pelo TAM interescapular, e, após seis sessões de irradiação foram observados aumento significativo na massa do TAM e aumento de temperatura na região interescapular. A PBM, no entanto, não promoveu mudanças na expressão de UCP1 no TAM, indicando que a PBM pode agir por outros mecanismos para aumento da captação de ^{18}F -FDG.

A irradiação do TAB com LED 850 nm, apesar de não ter interferido na massa corporal, Índice de Lee e resposta ao TTG-IP dos animais tratados, diminuiu o número de macrófagos e leucócitos totais no TAB epididimal. A população de células inflamatórias desse tecido adiposo é majoritariamente constituída de macrófagos e essa porção continua mesmo após as irradiações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
2. Preventing chronic diseases: a vital investment. WHO global report. Genebra, Suíça: WHO Pres; 2005.
3. An estimation of the economic impact of chronic noncommunicable diseases in selected countries 2006. http://www.who.int/chp/working_paper_growth%20model29may.pdf (accessed).
4. Bahia LR, da Rosa MQM, Araujo DV, et al. Economic burden of diabetes in Brazil in 2014. *Diabetol Metab Syndr* 2019; **11**: 54.
5. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. 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* 2009; **120**(16): 1640-5.
6. Grundy SM, Brewer HBJ, Cleeman JI, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; **109**(3): 433-8.
7. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1995 Maio; **24**: 9-15.
8. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; **259**: 87-91.
9. Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, et al. Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*. 1994; **234**: 64-70.
10. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor- α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994; **43**: 1271-8.
11. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011; **29**: 415-45.
12. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annual Review of Physiology*. 2010; **72**: 219-46.
13. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2000; **21**: 697-738.
14. Gilbert CA, Slingerland JM. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. *Annu Rev Med*. 2013; **64**: 45-57.
15. Aggarwal BB. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr*. 2010; **30**: 173-99.
16. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007; **356**: 1517-26.
17. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science*. 2001; **293**: 1673-7.
18. Goldfine AB, Silver R, Aldhahi W, et al. Use of salicylate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Clin Transl Sci*. 2008; **1**: 36-43.
19. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr*. 2012; **32**: 261-86.

20. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. Geneva: World Health Organization; 2013.
21. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;516-33.
22. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012;71-8.
23. Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time. *Lasers Surg Med.* 2007;543-50.
24. Pires D, Xavier M, Araújo T, Silva Junior JA, Aimbire F, Albertini R. 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.* 2011;85-94.
25. Bjordal JM, Lopes-Martins RAB, Joensen J, Iversen VV. The anti-inflammatory mechanism of low level laser therapy and its relevance for clinical use in physiotherapy. *Physical Therapy Reviews.* 2010;286-93.
26. Ucero AC, Sabban B, Benito-Martin A, Carrasco S, Joeken S, Ortiz A. Laser therapy in metabolic syndrome-related kidney injury. *Photochemistry and Photobiology.* 2013;953-60.
27. Oliveira FAM, Moraes ACM, Paiva AP, et al. Low-level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis. *Photomed Laser Surg.* 2012;705-13.
28. França CM, Santana CL, Takahashi CB, et al. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2013;1331-8.
29. Hsieh Y-L, Chou L-W, Chang P-L, Yang C-C, Kao M-J, Hong C-Z. 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.* 2012;2903-16.
30. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. 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.* 2008;371-8.
31. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2009;37-42.
32. Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med.* 2013;349-57.
33. Jackson RF, Dedo DD, Roche GC, Turok DI, Maloney RJ. Low-level laser therapy as a non-invasive approach for body contouring: a randomized, controlled study. *Lasers Surg Med.* 2009;799-809.
34. Caruso-Davis MK, Guillot TS, Podichetty VK, et al. Efficacy of low-level laser therapy for body contouring and spot fat reduction. *Obes Surg.* 2011;722-9.
35. Neira R, Arroyave J, Ramirez H, et al. Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2002;912-22.
36. Sene-Fiorese M, Duarte FO, de Aquino Junior AE, et al. The potential of phototherapy to reduce body fat, insulin resistance and "metabolic inflexibility" related to obesity in women undergoing weight loss treatment. *Lasers Surg Med* 2015; **47**(8): 634-42.
37. Yoshimura TM, Sabino CP, Ribeiro MS. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. *J Biophotonics* 2016.
38. Silva G, Ferraresi C, de Almeida RT, et al. Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice. *Lasers Med Sci* 2018; **33**(3): 559-71.
39. Saito M. Brown adipose tissue as a therapeutic target for human obesity. *Obes Res Clin Pract* 2013; **7**(6): e432-8.
40. Seale P, Lazar MA. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* 2009; **58**(7): 1482-4.

41. Enerback S. Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34 Suppl 1**: S43-6.
42. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1509-17.
43. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1518-25.
44. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1500-8.
45. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;1595-607.
46. Kennedy AJ, Ellacott KLJ, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*. 2010:156-66.
47. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012.
48. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998:763-70.
49. Alfredo Martínez J, Enríquez L, Moreno-Aliaga MJ, Martí A. Genetics of obesity. *Public Health Nutr*. 2007:1138-44.
50. Walley AJ, Asher JE, Froguel P. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet*. 2009:431-42.
51. Becskei C, Lutz TA, Riediger T. 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*. 2010:R632-41.
52. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*. 2004:243-8.
53. Harbilas D, Brault A, Vallerand D, et al. *Populus balsamifera* L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model. *J Ethnopharmacol*. 2012:1012-20.
54. Rebuffé-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1993:1405-9.
55. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995:645-51.
56. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006:115-24.
57. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*. 2011.
58. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007:798-808.
59. Bagnol D, Al-Shamma HA, Behan D, Whelan K, Grottick AJ. Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2012:9.38.1–9.13.
60. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2018; **14**(3): 140-62.
61. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; **15**(4): 798-808.
62. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 351982.
63. Bagnol D, Al-Shamma HA, Behan D, Whelan K, Grottick AJ. Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Curr Protoc Neurosci* 2012; **Chapter 9**: Unit 9.38.1-13.
64. Belchior T, Paschoal VA, Magdalon J, et al. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent actions. *Mol Nutr Food Res* 2015; **59**(5): 957-67.

65. Lee MO. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 1929; **89**(1): 24-33.
66. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; **40**(4): 527-8.
67. Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol* 2014; **222**(3): G13-25.
68. Mester E, Szende B, Tota JG. Effect of laser on hair growth of mice. *Kiserl Orvostud.* 1967:628-31.
69. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971:532-5.
70. Mester E, Nagylucskay S, Doklen A, Tisza S. Laser stimulation of wound healing. *Acta Chir Acad Sci Hung.* 1976:49-55.
71. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 2017; **4**(3): 337-61.
72. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999:1-17.
73. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 hours. *Photochem Photobiol* 2015; **91**(2): 411-6.
74. Leonarduzzi G, Sottero B, Testa G, Biasi F, Poli G. New insights into redox-modulated cell signaling. 2011:3994-4006.
75. Garcez AS RM, Núñez SC. Mecanismos de terapia laser de baixa potência. *Laser de baixa potência: princípios básico se aplicações clínicas na odontologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2012: 27-43.
76. Garcez AS, Ribeiro MS, Núñez SC. Interação laser-tecido biológico e princípios de dosimetria. *Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2012: 14-27.
77. Garcez AS, Ribeiro MS, Núñez Sc. Mecanismos de terapia laser de baixa potência. *Laser de baixa potência: princípios básico se aplicações clínicas na odontologia.* Rio de Janeiro: Elsevier: 27-43.
78. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998:1145-58.
79. Blüher M. Adipokines – removing road blocks to obesity. *Mol Metab.* 2014:230-40.
80. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994:452-32.
81. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered.* 1950:317-8.
82. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 1966:1127-8.
83. Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol.* 1959:336-52.
84. Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol.* 1969:1298-304.
85. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973:294-8.
86. Procaccini C, Pucino V, De Rosa V, Marone G, Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front Immunol.* 2014:143.
87. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000:437-46.

88. Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol*. 2000;15-24.
89. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998;57-65.
90. Bigornia SJ, Farb MG, Mott MM, et al. Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr Diabetes* 2012; **2**(3): e30-.
91. Kim SH, Chung JH, Song SW, Jung WS, Lee YA, Kim HN. Relationship between deep subcutaneous abdominal adipose tissue and metabolic syndrome: a case control study. *Diabetol Metab Syndr* 2016; **8**: 10.
92. Verboven K, Wouters K, Gaens K, et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 4677.
93. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; **96**(9): 939-49.
94. Hopkins PA, Srisakandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol*. 2005;395-407.
95. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2008;3015-25.
96. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;739-45.
97. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2008;2595-602.
98. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;R698-709.
99. Garay-Malpartida HM, Mourão RF, Mantovani M, Santos IA, Sogayar MC, Goldberg AC. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol*. 2011.
100. Li M, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. 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*. 2012;260-7.
101. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;16683-9.
102. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, et al. 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*. 2011;E146-50.
103. Rasband W. ImageJ. 1.50b ed. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health; 1997-2014.
104. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014; **13**(9): 1400-12.
105. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; **19**(10): 1252-63.
106. Ricquier D. Uncoupling Protein 1 of Brown Adipocytes, the Only Uncoupler: A Historical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; **2**.
107. Lowell BB, V SS, Hamann A, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993; **366**(6457): 740-2.
108. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2016; **22**(3).

109. David JM, Chatziioannou AF, Taschereau R, Wang H, Stout DB. The hidden cost of housing practices: using noninvasive imaging to quantify the metabolic demands of chronic cold stress of laboratory mice. *Comp Med* 2013; **63**(5): 386-91.
110. Crane JD, Mottillo EP, Farncombe TH, Morrison KM, Steinberg GR. A standardized infrared imaging technique that specifically detects UCP1-mediated thermogenesis in vivo. *Mol Metab*; 2014: 490-4.
111. Wang X, Minze LJ, Shi ZZ. Functional imaging of brown fat in mice with 18F-FDG micro-PET/CT. *J Vis Exp* 2012; (69).
112. Lim S, Honek J, Xue Y, et al. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 2012; **7**(3): 606-15.
113. Razzoli M, Frontini A, Gurney A, et al. Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. *Mol Metab* 2016; **5**(1): 19-33.
114. Argmann CA, Auwerx J. Collection of blood and plasma from the mouse. *Curr Protoc Mol Biol* 2006; **Chapter 29**: Unit 29A.3.
115. Cui L, Butler HJ, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Aluminium foil as a potential substrate for ATR-FTIR, transfection FTIR or Raman spectrochemical analysis of biological specimens. *Analytical Methods* 2016; **8**: 481-7.
116. Baloglu F, Garip S, Heise S, Brockmann G, Severcan F. FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation. *Analyst* 2015; **140**(7): 2205-14.
117. Liu KZ, Shaw RA, Man A, Dembinski TC, Mantsch HH. Reagent-free, simultaneous determination of serum cholesterol in HDL and LDL by infrared spectroscopy. *Clin Chem* 2002; **48**(3): 499-506.
118. Shaw R, Kotowich S, Leroux M, Mantsch H. Multianalyte serum analysis using mid-infrared spectroscopy. *Annals of Clinical Biochemistry* 1998; **35**: 624-32.
119. Johnson F, Mavrogianni A, Ucci M, Vidal-Puig A, Wardle J. Could increased time spent in a thermal comfort zone contribute to population increases in obesity? *Obes Rev* 2011; **12**(7): 543-51.
120. Whittle AJ, Lopez M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* 2011; **17**(8): 405-11.
121. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2013; **123**(1): 215-23.

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

Comissão de Ética no Uso de Animais

Parecer - Projeto Nº 143/14/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“LUZ DE BAIXA POTÊNCIA COMO PROPOSTA TERAPÊUTICA À SÍNDROME METABÓLICA EM MODELO ANIMAL”** 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, 28 de junho de 2014.

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

ANEXO 2: ARTIGO PUBLICADO

J. Biophotonics 9, No. 11–12, 1255–1262 (2016) / DOI 10.1002/jbio.201600088

Journal of
BIOPHOTONICS

FULL ARTICLE

Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice*Tania Mateus Yoshimura^{*,1,2}, Caetano Padial Sabino³, and Martha Simões Ribeiro¹*¹ Laboratory of Optical Therapy (Center for Lasers and Applications/Nuclear and Energy Research Institute), Av. Professor Lineu Prestes, 2242, 05508-010, São Paulo, SP, Brazil² Nuclear Technology Postgraduate Program, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 2242, 05508-010, São Paulo, Brazil³ Department of Clinical Analysis (School of Pharmaceutical Sciences), University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, 05434-070, São Paulo, Brazil

Received 7 April 2016, revised 14 August 2016, accepted 21 August 2016

Published online 17 September 2016

Key words: diabetes, metabolic syndrome, phototherapy, obesity, inflammation, metaflammation, low-level light therapy, LLLT

Systemic inflammation is closely related to the development of insulin resistance and type-2 diabetes, since the activation of pro-inflammatory pathways leads to inhibition of insulin signaling. Although photobiomodulation (PBM) has proven beneficial effects on the treatment of inflammatory disorders, the phototherapeutic approach to manage the chronic inflammatory component of obesity and hyperglycemia had never been explored. In this work, obese and hyperglycemic mice are treated with PBM, and their body mass, glycemia and inflammatory infiltrate of abdominal adipose tissue are evaluated. During four weeks, irradiated animals are exposed to six irradiation sessions using an 843 nm LED (5.7 J cm^{-2} at 19 mW cm^{-2} per session). Non-irradiated control animals display inflammatory areas almost five times greater than the treated group ($p < 0.001$). This result on inflammatory infiltrate may have caused impacts on the significant lower blood glucose level from irradiated animals ($p = 0.04$), twenty-four hours after the last irradiation session.

PBM on obese and hyperglycemic mice reduced five times the areas of inflammatory infiltrate within abdominal adipose tissue (**a**, **b**), whereas dense inflammatory regions were a common finding amidst non-irradiated animals (**c**). The asterisks on (**c**) correspond to the inflammatory infiltrate permeating adipocytes.

* Corresponding author: e-mail: tania.my@gmail.com

1. Introduction

Hyperglycemia and obesity are closely related morbidities and cornerstone clinical conditions featured in metabolic syndrome (MetS), which, by definition, is a cluster of metabolic disorders that greatly increases the risk of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and cardiovascular diseases (CVD) [1, 2].

Metaflammation [3], the characteristic chronic inflammation observed in obese individuals, may play a crucial role in MetS [4, 5]. In 1995, Hostamisligil et al. [6] were the first reporting increased tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in the adipose tissue of obese subjects, a trait the authors have previously observed in murine models of obesity [7–9]. Since then, studies have been reporting obese and hypertrophied white adipose tissue as richly permeated by leukocytes, expressing not only increased TNF- α levels, but also other pro-inflammatory cytokines and chemokines [10–12]. Inflammatory signaling through activation of Toll-like and TNF receptors (TLRs and TNFRs, respectively) pathways leads to intracellular inhibition of insulin signaling by direct interferences on insulin receptor function and its ability to initiate the insulin signal transduction pathway [10–12]. Hence, systemic inflammatory state is closely related to the development of insulin resistance, hyperglycemia and T2DM since insulin-dependent tissues, such as skeletal muscle and white adipose tissue, become less responsive to this hormone.

Therapies targeting MetS, as well as its underlying pathologies, are of crucial importance due to its imposed socioeconomic burden and death-toll: cardiovascular diseases and diabetes might be liable for 18 million deaths that occurred globally in 2008 [13]. Last year, the worldwide expenditures reached the stratospheric figure of 673 billion dollars spent only in diabetes healthcare [14]. These values do not account for the intangible costs related to the impaired quality of life of people living with MetS, which presently are estimated by one-quarter of the entire world population [1, 15].

If inflammation is a common etiological agent behind all these pathologies, a therapeutic approach that offers proven effectiveness to modulate inflam-

matory signaling with minimum to none adverse effects is of noteworthy value in the management of MetS and its underlying morbidities. Several studies have been acknowledging photobiomodulation (PBM) as an appealing therapy for inflammatory disorders thanks to its immunomodulatory properties, whether by upregulating anti-inflammatory signaling or downregulating pro-inflammatory pathways [16–20]. Nevertheless, the phototherapeutic approach to manage the chronic inflammatory component of obesity and hyperglycemia has not yet been explored. We therefore addressed this question investigating if PBM applied to abdominal white adipose tissue can affect the inflammatory component of MetS to intervene on blood glucose levels and body mass of diet-induced obese and hyperglycemic mice.

2. Experimental

2.1 Animal model

Four weeks old male adult C57BL/6 mice were fed a hypercaloric high-fat chow during eight weeks in order to induce obesity and hyperglycemia. This diet was modified from standard chow to provide at least 40% calories derived from fat, an amount sufficient to achieve our model goals [21–23]. The nutritional composition from the modified diet (Table 1) was produced by the addition of whole milk powder, soybean oil and corn syrup to the standard chow, in proportions presented in Table 1. Throughout the experiments, animals were individually housed in isolator cages under a 12 h daylight cycle. All the procedures and handling were in accordance with international guidelines for care and use of laboratory animals [24], and were approved by our institutional animal ethics committee (143/14-CEUA/IPEN-SP).

Blood glucose levels were monitored by a portable glucometer (OneTouch® Ultra®, Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics). Blood samples were withdrawn via tail puncture after a 3 h daytime food restriction. Body mass and blood glucose were assessed regularly during the entire experimental course.

Table 1 Nutritional and ingredient composition of the high-fat and hypercaloric diet, modified from a standard chow.

Nutritional and ingredient composition				
Amount per 100 g		% TCV ^a	Ingredients	(m/m)% ^b
Energy	434 kcal = 1,816 kJ	–	Standard chow	40.0
Carbohydrates	46 g	42.4	Milk powder	25.0
Proteins	17 g	16.0	Soybean oil	20.0
Total fat	20 g	41.6	Corn syrup	15.0

^a Percentage of total caloric value; ^b Mass percentage

Figure 1 Picture showing a mouse during an irradiation session. When positioned at 1.5 cm perpendicularly above the abdominal surface, the 843 nm light source provided 3.14 cm^2 of illuminated area, delivering 5.7 J cm^{-2} (irradiance) and 19 mW cm^{-2} (radiant exposure), which resulted in 18 J of total energy per session delivered during 300 s. Animals were maintained under sedation during this period, and they had their abdomen fur previously depilated.

2.2 Photobiomodulation

Our light source was a custom-made continuous-wave light emitting diode (LED), with a Gaussian irradiance profile, peak wavelength emission at 843 nm and full width at half maximum (FWHM) of 38 nm, adjusted to provide a total of 60 mW of optical output power. Positioned 1.5 cm perpendicularly from the abdominal surface and illuminating an area of 3.14 cm^2 (Figure 1), the light-source delivered 5.7 J cm^{-2} (radiant exposure) and 19 mW cm^{-2} (irradiance) to the target abdominal tissue, totalizing an exposure time of 300 s and delivering 18 J of total energy per session.

After the initial eight-week diet-induced obesity and hyperglycemia, irradiations were performed at days 1, 3, 7, 10, 14 and 21. Animals were required to remain inert in supine position during the entire procedure, hence they were intraperitoneally injected with a ketamine:xylazine solution (80 mg:10 mg per kilogram of body mass) for sedation.

To minimize hair interference with light delivery during irradiation, one day before each session the abdomen of animal subjects was inspected for presence of fur. If hair was observable, abdominal region was sheared with an electric shaver and depilated with a thioglycolate-based chemical (Veet

Cream®, Reckitt Benckiser, Brazil), while mice were under sedation with a ketamine:xylazine solution.

Mice from the control group (C), i.e. non-irradiated, were submitted to the same procedure as the PBM group (L) nevertheless the LED remained powered off during the sham-treatment sessions.

All animals continued to receive the modified high-fat diet until the end of experiments.

2.3 Histomorphometry

Twenty-four hours after the last irradiation session, animals were euthanized with overdose of chemical anesthetics (ketamine and xylazine) followed by cervical dislocation. Subcutaneous samples from abdominal area were harvested, 10% formalin-fixed and routinely processed for histology and hematoxylin-eosin staining.

Different regions of interest with areas of $1180 \times 885.23 \mu\text{m}^2$ were selected from each slide and photographed at 100 $\times$ magnification. Images were processed and analyzed using ImageJ 1.50b software [25]. Since the nuclei of inflammatory cells are intensely stained by hematoxylin, it is feasible to quantify their relative area after simple image processing as described in further detail below.

Initially, the original photomicrograph was converted into black and white 32-bit image, which was then used as input to two different thresholding adjustments. The first was set to eliminate (convert to blank) areas not populated with cells. The remaining black areas were quantified, and the results were set as the total areas. The second threshold was tuned to only preserve areas permeated by inflammatory cells. This area was also quantified and normalized to the total area, resulting in the percentages of area with inflammatory cells presented in our results.

As the threshold determination is just a standard algorithm to assist in the experiment, the resulting images were manually examined, and any residual noise and portions of the image not belonging to cells or tissue of interest were cautiously excluded from the calculations. At least 10 fields from the original slides were quantified for each sample.

2.4 Statistical analysis

All data were submitted to Shapiro-Wilk normality test before comparisons. For all tests, differences were considered significant when $p < 0.05$.

Paired sample *t*-test was performed to verify changes in body mass and blood glucose after the eight weeks of diet-induced obesity and hyperglycemia. Our results regarding PBM effects on glycemia

and body mass were submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and Tukey as *post-hoc* test. The areas populated with inflammatory cells were calculated in relation to the total cell area from the adipose tissue, and Mann-Whitney test was chosen to perform comparisons between groups.

3. Results and discussion

After eight weeks receiving the hypercaloric and high-fat diet, animals gained 9.48 ± 2.75 g, which corresponds to a 32.16 % mass gain and an average final body mass of 38.78 ± 3.91 g (Figure 2). This is an important result considering age-matched C57BL/6 weighting 27.7 ± 1.7 g at 12 weeks of age under a standard chow [26, 27]. Our modified diet also promoted satisfactory results regarding blood glu-

cose levels: a 13.7% increment was observed after the first eight weeks, which means an increase from 146 ± 29 to 166 ± 28 mg dL⁻¹ ($p = 0.034$).

So far, our experimental model is in agreement with previous studies aiming to simulate human clinical conditions of obesity and hyperglycemia to a murine model [28–30]. To our knowledge, there are no publications available using PBM to manage the chronic inflammatory component of obesity and hyperglycemia, therefore our irradiation parameters needed to be adapted from PBM protocols applied to the treatment of diverse chronic inflammatory disorders. For instance, Ucero [19] and França [31] et al. observed beneficial results on chronic kidney injury and skeletal muscle repair, respectively, after daily irradiation sessions performed on rats. Notwithstanding that we have also considered the daily requirement for anesthetics as source of possible deleterious metabolic effects to our animals [32], which led us to choose an irradiation protocol similar to Pires [16] and Casalechi [33] et al. Both groups investigated inflammatory modulation using PBM to treat induced chronic tendinitis in rats, and possible different outcomes depending on the moment of the first session as well on the extent of the treatment. Regarding mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), Pires et al. [16] observed greater reductions when the irradiation sessions began seven days after induction of collagenase tendinitis, in comparison to an immediate application. Their work has also shown better inflammatory outcomes when irradiation sessions were distributed in 14 days when compared to only 7 days.

Whereas there are no resemblances between our animal model and the abovementioned, we reiterate how scarce literature is regarding light application to chronic and persistent inflammatory settings. In our case, inflammatory stimuli are continuous, i.e., as long as animals are receiving a high-fat diet inflammatory response will be positively fed back. When planning our irradiation protocol, we have assumed our intervention would demand more time to promote detectable effects. In order to prevent bio-inhibitory effects due to the classically accepted PBM's biphasic dose response [34, 35], we were inclined to sparsely distribute the irradiation sessions, which led us to a treatment protocol comprising six sessions during the course of four weeks.

Throughout the treatment no significant changes were observed between groups in respect to body mass (Figure 3), even though some differences occurred within subjects. Both groups presented lower body mass on the last day when compared to their initial values ($p < 0.001$). Once we have initiated the experimental procedures, weight gain rate decreased noticeably in comparison to the observed increasing rate during the first eight weeks of obesity and hy-

Figure 2 Body mass gain and changes in blood glucose levels after the initial 8 weeks of diet-induced obesity and hyperglycemia. Data are displayed as means $\pm$ standard deviations ($n = 12$). Paired sample *t*-test showed significant differences between weeks 0 and 8 for both body mass ($p < 0.001$) and blood glucose ($p = 0.034$).

Figure 3 Comparison between groups regarding body mass and blood glucose levels variation throughout PBM course. Two-way ANOVA with repeated measures using Tukey as *post-hoc* was performed to compare means of irradiated (L, $n = 6$) and control (C, $n = 6$) groups. Animals submitted to PBM presented significant lower blood glucose levels one day after the last irradiation session ($p = 0.04$). Data are presented as means $\pm$ standard deviations, and the arrows are pointing the days when animals were irradiated.

perglycemia induction. Since this was a coincident behavior for either groups, we presume the effect on body mass might be assignable to the repeated injection of anesthetics and their inflicted prolonged recovery time [32]. Both ketamine and xylazine are highly lipophilic agents [36], i.e., they accumulate in adipose tissue. Obese animals, as in the case of the present study subjects, can consequently exhibit altered biodistribution and pharmacokinetics to this class of chemical agents, which could have led to the observed influences in body mass gain rate. Although we observed a downslope on weight gain, animals did not present behavioral signs associated with sickness or distress and at the end of our study they maintained a good health status.

Regarding blood glucose, irradiated animals presented significant lower glycemia after the last day

of treatment in comparison to their control counterparts ($p = 0.04$, Figure 3). Although one could argue the anesthetics and their adverse effects were responsible for the noted downslope in blood glucose levels during PBM sessions, anesthetics alone cannot advocate for this statistical difference, once control animals were sham-treated and, therefore, were submitted to the same sedation protocol. Undoubtedly this result on glycemic profile needs to be cautiously examined due to limitations imposed by the chosen anesthetic plane. Nonetheless we cannot disregard the possible photobiomodulatory effects on blood glucose levels promoted by infrared light irradiation of visceral fat tissue.

A possible explanation to the observed significant lower glycemic levels in PBM-treated animals could be associated to increase of mitochondrial metabolism rate from the abdominal muscles that were also illuminated during irradiation sessions. In fact, this hypothesis was addressed by Aquino et al. [37] when they investigated the effects of PBM combined with physical exercises on the lipid profile of diabetic rats, with irradiations being performed on hindlimb muscles (quadriceps and gastrocnemius). The authors did not evaluate blood glucose levels, but important outcomes were only observed for animals that underwent light irradiations and physical exercises sessions. These individuals presented better lipid profile, increased glycogen storages in muscles and lesser fat deposition in liver tissue. Their investigation did not provide sufficient mechanistic basis to explain all results, but the authors hypothesized that the irradiated muscles from trained animals had increased mitochondrial activity, which could have led to enhanced levels of aerobic metabolism, and consequently decrease plasma lipid levels over time. Although animals only submitted to either physical exercises or light exposure did not present such pronounced outcomes, suggesting that these interventions are necessary but not sufficient to produce such pronounced outcomes as observed for animals that underwent the combined approach. Since in our study all subjects were sedentary, we presume that enhanced substrate consumption by irradiated abdominal muscle tissue may only have produced minor influence on our results, so that the observed effects were most likely caused by direct modulation of fat tissue metabolism.

This explanation, however, could seem speculative. Therefore, we explored inflammatory characteristics of the adipose tissue through histomorphometric analysis, which showed concise and compelling results. The adipose tissue of untreated animals was remarkably infiltrated by inflammatory cells, as can be seen in Figure 4a. Dense inflammatory areas were a common finding amongst non-irradiated animals, whereas mice from PBM group mostly displayed absent or minor areas of inflammatory infil-

Figure 4 Photomicrographs presenting adipose tissues from control (a) and irradiated (b) animals. After being submitted to six sham or PBM treatment sessions during the course of 21 days, obese mice were euthanized and their subcutaneous abdominal tissues were harvested. Following hematoxylin-eosin staining, the obtained slides were analyzed in search for inflammatory cells, which characteristically present intensely hematoxylin-stained nuclei. Note the substantial inflammatory infiltrate permeating adipocytes in figure (a), a common finding amongst samples from control subjects. Conversely, animals from PBM group displayed a more homogeneous adipose tissue with minor or absent areas of inflammatory infiltrate. (Scale bars represent 100 μm at 100 $\times$ magnification, and asterisks are highlighting areas with inflammatory cells).

trate (Figure 4b). These qualitative observations were confirmed by the analysis of the areas with immune cells (Figure 5). After quantification, a significant difference was noticeable between groups, with control animals presenting relative inflammatory areas almost five times greater than treated animals (23.29% versus 4.78%, $p < 0.001$).

The effects on inflammatory infiltrate could help explain the significant reduced blood glucose levels

Figure 5 Control (C) and irradiated (L) groups compared by extension of areas with inflammatory cells permeating the adipose tissue. The boxplots represent percentiles 25, 50 and 75 and the whiskers stand for the 95% confidence interval (CI). Outliers not comprised between the CI are displayed as crosses. Mann-Whitney comparison test confirmed significant differences between groups ($p < 0.001$).

observed after the last irradiation session (Figure 3), which occurred in the same day tissue samples were harvested. Considering that the abdominal adipose tissue from treated animals presented diminished areas of inflammatory infiltrates, we may assume that their adipocytes were less exposed to pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. If so, it can be hypothesized that insulin signaling pathway was less inhibited by the activation of TLRs and TNFRs, resulting in a locally improved insulin response promoted by PBM. Whereas our investigation does not provide mechanistic basis to explain our hypothesized association, the literature has a strong body of evidence supporting such direct relationship [2–4, 11, 12]. For instance, a 2014 review from Esser et al. [5] compiled several pre-clinical and clinical studies using anti-inflammatory agents, such as antagonists of TNF- α , IL-1 β and IL-6, to the management of T2D and CVD. Some promising results have shown better insulin response after the suppression of inflammatory pathways, either by increasing insulin secretion or by improving its action.

Our investigation proposing PBM as a therapeutic platform for management of MetS is an initial step towards a goal that has been intensely investigated by other research fields, such as endocrinology, immunology and physiology. In this sense we would like to stimulate the Biophotonics community to also consider obesity as an inflammatory condition that can be managed by phototherapeutic approaches. Hence, we encourage future studies investigating the application of different light parameters to manage the chronic inflammatory component of obesity and hyperglycemia. Assuming that copper centers of cytochrome c oxidase [34, 38, 39] can be better stimulated by lower wavelengths of light, di-

verse variations of irradiation protocols can potentially lead to further positive effects. Considering that only slight variations (<10%) of light transmittance through mouse skin is observed among wavelengths ranging from 650 nm to 850 nm [40], it can be assumed that red light can reach subcutaneous fat tissue just as well as near-infrared light.

This scenario leads us to anticipate the development of new research initiatives with innovative therapeutic approaches focusing on immunomodulation of metabolic diseases. In the present study, we propose PBM as a potential therapeutic platform to be contemplated among these forthcoming investigations. Considering the intrinsic systemic inflammatory state observed in obese individuals and its imposed impairment on insulin signaling pathways, PBM offers feasible clinical applications. Additionally, it is already possible to develop full-body irradiation equipment or LED cluster-boards to apply PBM therapy to insulin-independent tissues as an adjuvant therapy to improve insulin sensitivity, therefore assisting on the healthcare and quality of life of people living with MetS and its associated morbidities.

4. Conclusion

After eight weeks under high-fat hypercaloric diet mice became obese and hyperglycemic. The group submitted to PBM treatment presented inflammatory infiltrate areas within abdominal adipose tissue almost five times smaller in comparison to control group. This fact may have contributed to significant reduction of blood glucose levels observed in the PBM group after the last irradiation session.

Acknowledgements The authors would like to kindly thank São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #2014/02564-1) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support. We also thank Lucas Ramos De Pretto for the valuable insights.

Conflict of interest None of the authors have any conflicts of interest.

References

- [1] S. O'Neill and L. O'Driscoll *Obes Rev.* **16**, 1–12 (2015).
- [2] K. G. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, and S. C. Smith, Jr. *Circulation*. **120**, 1640–1645 (2009).
- [3] G. S. Hotamisligil *Nature*. **444**, 860–867 (2006).
- [4] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A. J. Scheen, and N. Paquot, *Diabetes Res Clin Pract.* **105**, 141–150 (2014).
- [5] N. Esser, N. Paquot, and A. J. Scheen, *Expert Opin Investig Drugs*. **24**, 283–307 (2015).
- [6] G. S. Hotamisligil, P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, and B. M. Spiegelman, *J Clin Invest.* **95**, 2409–2415 (1995).
- [7] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, *Science*. **259**, 87–91 (1993).
- [8] C. Hofmann, K. Lorenz, S. S. Braithwaite, J. R. Colca, B. J. Palazuk, G. S. Hotamisligil, and B. M. Spiegelman, *Endocrinology*. **134**, 264–270 (1994).
- [9] G. S. Hotamisligil and B. M. Spiegelman, *Diabetes*. **43**, 1271–1278 (1994).
- [10] M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil, *Annu Rev Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
- [11] J. M. Olefsky and C. K. Glass, *Annu Rev Physiol.* **72**, 219–246 (2010).
- [12] J. C. McNelis and J. M. Olefsky, *Immunity*. **41**, 36–48 (2014).
- [13] W. H. Organization in *Burden: mortality, morbidity and risk factors*, Vol. (Ed. W. H. Organization), WHO Press, Geneva, pp. 9–32 (2010).
- [14] IDF Diabetes Atlas, 7th Edition, International Diabetes Federation, <http://www.diabetesatlas.org/component/attachments/?task=download&id=116>, 2015.
- [15] D. W. Lam and D. LeRoith, in: *Metabolic Syndrome*, (Ed. L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, R. McLachlan, M. New, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik, M. O. Weickert), Endotext [Internet]. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2015.
- [16] D. Pires, M. Xavier, T. Araujo, J. A. Silva, Jr., F. Aim-bire, and R. Albertini, *Lasers Med Sci.* **26**, 85–94 (2011).
- [17] M. H. Hwang, J. H. Shin, K. S. Kim, C. M. Yoo, G. E. Jo, J. H. Kim, and H. Choi, *Photochem Photobiol.* **91**, 403–410 (2015).
- [18] A. C. Alves, R. Vieira, E. Leal-Junior, S. dos Santos, A. P. Ligeiro, R. Albertini, J. Junior, and P. de Carvalho, *Arthritis Res Ther.* **15**, R116 (2013).
- [19] A. C. Ucero, B. Sabban, A. Benito-Martin, S. Carrasco, S. Joeken, and A. Ortiz, *Photochem Photobiol.* **89**, 953–960 (2013).
- [20] D. F. Martins, B. L. Turnes, F. J. Cidral-Filho, F. Bobinski, R. F. Rosas, L. G. Danielski, F. Petronilho, and A. R. Santos, *Neuroscience*. 2016.
- [21] R. Buettner, J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, *Obesity (Silver Spring)*. **15**, 798–808 (2007).
- [22] S. K. Panchal and L. Brown, *J Biomed Biotechnol.* **2011**, 351982 (2011), doi: 10.1155/2011/351982.
- [23] D. Bagnol, H. A. Al-Shamma, D. Behan, K. Whelan, and A. J. Grottick, *Curr Protoc Neurosci.*, Chapter 9, Unit 9.38.31–13 (2012).
- [24] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition* (The National Academies Press, Washington, DC, 2011).
- [25] W. S. Rasband and U. S. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/> (1997–2016).
- [26] Body Weight Information for JAX® Mice Strain C57BL/6J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>.

- [27] C57BL/6 Mouse – Growth Chart, Charles River Laboratories International, Inc., <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>.
- [28] T. A. Lutz and S. C. Woods, *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5, Unit 5.61, (2012).
- [29] S. Collins, T. L. Martin, and R. S. Surwit, *J. Robidoux, Physiol Behav.* **81**, 243–248 (2004).
- [30] D. Harbilas, A. Brault, D. Vallerand, L. C. Martineau, A. Saleem, J. T. Arnason, L. Musallam, and P. S. Haddad, *J Ethnopharmacol.* **141**, 1012–1020 (2012).
- [31] C. M. Franca, C. de Loura Santana, C. B. Takahashi, A. N. Alves, A. P. De Souza Mernick, K. P. Fernandes, D. de Fatima Teixeira da Silva, S. K. Bussadori, and R. A. Mesquita-Ferrari, *Lasers Med Sci.* **28**, 1331–1338 (2013).
- [32] S. Gargiulo, A. Greco, M. Gramanzini, S. Esposito, A. Affuso, A. Brunetti, and G. Vesce, *Ilar J.* **53**, E55–E69 (2012).
- [33] H. L. Casalechi, E. C. Leal-Junior, M. Xavier, J. A. Silva, Jr., T. de Carvalho Pde, F. Aimbire, and R. Albertini, *Lasers Med Sci.* **28**, 989–995 (2013).
- [34] 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.* **40**, 516–533 (2012).
- [35] S. K. Sharma, G. B. Kharkwal, M. Sajo, Y. Y. Huang, L. De Taboada, T. McCarthy, and M. R. Hamblin, *Lasers Surg Med.* **43**, 851–859 (2011).
- [36] M. C. Giroux, P. Hélie, P. Burns, and P. Vachon, *Exp Anim.* **64**, 253–260 (2015).
- [37] A. E. Aquino, M. Sene-Fiorese, F. R. Paolillo, F. O. Duarte, J. C. Oishi, A. A. Pena, A. Duarte, M. R. Hamblin, V. S. Bagnato, and N. A. Parizotto, *Lasers Med Sci.* **28**, 1271–1280 (2013).
- [38] T. I. Karu and S. F. Kolyakov, *Photomed Laser Surg.* **23**, 355–361 (2005).
- [39] T. I. Karu and N. I. Afanas'eva, *Dokl Akad Nauk.* **342**, 693–695 (1995).
- [40] C. P. Sabino, A. M. Deana, T. M. Yoshimura, D. F. T. da Silva, C. M. França, M. R. Hamblin, and M. S. Ribeiro, *J Photochem Photobiol B: Biology* **60**, 72–78 (2016).

MANUSCRITOS PUBLICADOS NO PERÍODO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. Letícia Heineck Alvarenga, Renato Araujo Prates, Tania Mateus Yoshimura, Ilka Tiemy Kato, Luis Cláudio Suzuki, Martha Simões Ribeiro, Luis Rodolfo Ferreira, Sílvio Antônio dos Santos Pereira, Elizabeth Ferreira Martinez, Eduardo Saba-Chujfi. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 12(1), 2015.

Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. Silvia C Nuñez, Tania M Yoshimura, Martha S Ribeiro, Helena C Junqueira, Cleiton Maciel, Maurício D Coutinho-Neto, Maurício S Baptista. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015.

Exploring light-based technology for wound healing and appliance disinfection. Martha S Ribeiro, Silvia Cristina Núñez, Caetano P Sabino, Tania M Yoshimura, Camila R Silva, Gessé EC Nogueira, Hideo Suzuki, Aguinaldo S Garcez. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2015.

The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral region. Caetano P Sabino, Alessandro M Deana, Tania M Yoshimura, Daniela FT da Silva, Cristiane M França, Michael R Hamblin, Martha S Ribeiro. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2016.

Optical coherence tomography for blood glucose monitoring in vitro through spatial and temporal approaches. Lucas Ramos De Pretto, Tania Mateus Yoshimura, Martha Simões Ribeiro, Anderson Zanardi de Freitas. Journal of Biomedical Optics, 2016.

Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. Camila Ramos Silva, Fernanda Viana Cabral, Claudinei Francisco Morais de Camargo, Silvia Cristina Núñez, Tania Mateus Yoshimura, Arthur Cássio de Lima Luna, Durvanei Augusto Maria, Martha Simões Ribeiro. Journal of Biophotonics, 2016.

Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. M. da Silva Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni, T. M. Yoshimura. Photochemistry and Photobiology, 2017.

Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of Candida albicans in biofilms. Luis Cláudio Suzuki, Ilka Tiemy Kato, Renato Araujo Prates, Caetano Padial

Sabino, Tania Mateus Yoshimura, Tamires Oliveira Silva, Martha Simões Ribeiro.
Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**