

PUCPR - PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

HALINA CAMARGO SENHORINHO

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO
ADIPOSO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**CURITIBA
2008**

HALINA CAMARGO SENHORINHO

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO
ADIPOSO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Gerson Linck Bichinho
Co-Orientador: Prof. Dr. Percy Nohama

CURITIBA

2008

Senhorinho, Halina Camargo
S476e Efeitos do laser de baixa intensidade no tecido adiposo : um estudo
2008 experimental em ratos / Halina Camargo Senhorinho ; orientador, Gerson
Linck Bichinho ; co-orientador, Percy Nohama. – 2008.
104 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2008
Bibliografia: f. 95-104

1. Lasers - Uso terapêutico. 2. Lasers em medicina. 3. Tecido adiposo.
I. Bichinho, Gerson Linck. II. Nohama, Percy. III. Pontifícia Universidade
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.
IV. Título.

CDD 22. ed. – 610.28
617.058

Aos meus pais, José Senhorinho
e Vera Maria Guedes de Camargo
Senhorinho

Aos meus tios, Wilson Senhorinho
e Jane Manetti Senhorinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela superação de todos os obstáculos;

Ao Excelentíssimo Reitor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Prof. Dr. Clemente Ivo Juliatto, e ao Decano do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Prof. Dr. Alberto Accioly Veiga;

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde da PUCPR e Colaborador desta dissertação, Prof. Dr. Munir Antônio Gariba, pela confiança, oportunidade e atenção dispensada, assim como pelos conhecimentos a mim transmitidos;

Ao Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCPR, Prof. Dr. Waldemiro Gremski, por todo o auxílio nas diversas etapas desta dissertação, assim como pelos preciosos ensinamentos oferecidos;

Ao Orientador, Prof. Dr. Gerson Linck Bichinho, por ter me guiado por este longo caminho com muita dedicação, paciência, confiança e competência, além de todo o ensinamento prestado;

Ao Co-Orientador, Prof. Dr. Percy Nohama, pela paciência, excelência e valiosos conhecimentos proporcionados ao longo deste estudo;

À CAPES, Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudo;

À Profa Márcia Orlandoski pela disponibilidade e competência na análise estatística;

Ao Prof. Dr. Josué Bruginski de Paula pelas excelentes sugestões prestadas;

À equipe do Departamento de Bioquímica da PUCPR, sobretudo a Cleide Mariano de Brito, ao José Marcelo de Camargo e as professoras Maria Lúcia W. Kluppel, Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira, Marilene da Costa Santo e Patrícia Maria Campelo;

Ao pessoal do Biotério da PUCPR, a saber: Cândido José Thomaz Pereira, Rafael Zotz, Alaércio Zeglan, Antônia Suely da Silva e Charlei Pires Machado;

À equipe do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, essencialmente ao Prof. Dr. Fernando Hintz Greca, Misael Gomes Barbosa e Álvaro Roberto Gonçalves Machado;

Ao pessoal do Laboratório de Anatomia Patológica na Pesquisa Clínica e Experimental da PUCPR, especialmente à Profa. Dra. Lúcia de Noronha, Ana Paula Camargo Martins e Marina Louise Viola de Azevedo;

À equipe do Laboratório Experimental de Cultura de células da PUCPR;

Aos integrantes do Laboratório de células inflamatórias e neoplásicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, em especial à Profa. Dorly de Freitas Bucchi, à Simone Martins de Oliveira e Ana Paula Ressetti Abud;

Ao pessoal do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME), sobretudo à Cleusa Bona e ao Sérgio Tokunaga;

Aos demais Professores da PUCPR que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão do presente trabalho: Profa. Dra. Vera Lúcia Israel, Profa. Maristela Palma, Profa. Dra. Elisângela Ferretti Manfra, Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira, Prof. Dr. Mardson Freitas de Amorim, Profa. Dra. Andréa Novais Moreno, Profa. Dra. Lia Sumie Nakao, Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza e Prof. Dr. Marcelo Távola Mira;

À Erli Ivanilde Bianco, do PPGTS, pela dedicação, paciência e compreensão;

À KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA, juntamente com os queridos amigos Alexandre Henrique Nowotny e Jean Paulus Nowotny por todo o auxílio prestado;

Ao acadêmico Luiz Eduardo Nunes Ferreira pelo importante auxílio na extenuante fase experimental do trabalho;

Aos meus queridos amigos Edson Folador, Andréa Delphim e Crystiane Oliveira por toda a paciência, incentivo e companheirismo;

Às minhas queridas primas Bárbara e Bruna Senhorinho pela convivência, apoio e incentivo;

Às pessoas com quem convivi durante este período pela paciência e compreensão a mim dedicadas.

“... todo um mundo vago se abre a nossa alma, nossa sensibilidade perde-se nele como o nosso olhar; e nós aspiramos entregar todo o nosso ser, para que a volúpia de um sentimento grande, único e majestoso o encha completamente ...”

Johann Wolfgang Von Goethe

RESUMO

Os efeitos do Laser de baixa intensidade no tecido adiposo são, praticamente, desconhecidos. Frente a isso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a influência do Laser de baixa intensidade no tecido adiposo em ratos. A amostra foi constituída por 42 *Rattus norvegicus albinus* adultos, fêmeas, randomizados em dois grupos. Os animais foram submetidos à tricotomia da região torácica dorsal e o grupo E foi exposto ao Laser de In-Ga-Al-P, sendo C o grupo controle. Previamente à eutanásia, o tecido estimulado foi excisado e submetido ao tratamento para microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. A avaliação bioquímica consistiu na quantificação do glicerol plasmático. O tratamento estatístico foi realizado por intermédio dos testes t de Student, Wilcoxon e Mann-Whitney ($p < 0,05$). No que concerne aos resultados, a diferença percentual do glicerol plasmático, pré e pós laserterapia, mostrou-se em $29,12 \pm 35,19\%$ e $5,28 \pm 26,42\%$ para o grupo E e C, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa para E. A área média dos adipócitos uniloculares apresentou-se em: 1.773 ± 432 pixels para E e 2.217 ± 532 pixels para C, com diferença significativa entre eles. No que tange às organelas citoplasmáticas, houve uma tendência ao aumento do número e morfometria das mitocôndrias no grupo submetido à laserterapia de baixa intensidade. A partir destes resultados, pode-se concluir que a aplicação do Laser de baixa intensidade, nas condições propostas, promove aumento nas concentrações de glicerol plasmático, redução dos adipócitos uniloculares, assim como uma tendência ao aumento no número e tamanho das mitocôndrias.

Palavras-chave: Lasers. Terapia a Laser de baixa intensidade. Ratos. Tecido adiposo.

ABSTRACT

The effects of low-level Laser on adipose tissue are practically unknown. The purpose of this study consisted in characterizing the influence of low-level Laser on adipose tissue in rats. The sample was constituted by 42 *Rattus norvegicus albinus*, females, adults, randomized in two groups. All animals were submitted to tricotomy of the dorsal thoracic region and the E group was exposed to the In-Ga-Al-P Laser. The C group was the control one. Before euthanasia, the stimulated tissue was excised and submitted to treatment for optical microscopy and transmission electron microscopy. The biochemical evaluation consisted in the quantification of serum glycerol. The statistical analysis was done by t Student test, Wilcoxon test, as well as by Mann-Whitney test, with 5% of statistical significance. Concerning the results, the percent difference between the serum glycerol before and after the laser application, was: 29.12 ± 35.19 and 5.28 ± 26.42 for E and C groups, respectively, with statistically significant difference for E. The average area was $1,773 \pm 432$ pixels for E and $2,217 \pm 532$ pixels for C, with statistically significant difference between them. Regarding the cell organelles, there was a tendency towards an increase on the number and size of the mitochondria in the group submitted to low-level Laser. From these results it can be concluded that the low-level Laser application, under conditions proposed, promotes an increase in the serum glycerol, reduction in white adipocytes and a tendency towards an increase in the number and size of the mitochondria.

Key-words: Lasers. Low-level Laser therapy. Rats. Adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fotomicrografia de tecido adiposo unilocular e multilocular	23
Figura 2	Eletromicrografia de célula adiposa unilocular	24
Figura 3	Estágios da diferenciação dos adipócitos	27
Figura 4	Lipólise adipocitária	29
Figura 5	Absorção estimulada, emissão espontânea e estimulada de radiação ...	37
Figura 6	Espectro eletromagnético	40
Figura 7	Composição básica de um diodo Laser	44
Figura 8	Interação entre a radiação e o tecido biológico	48
Figura 9	Trajeto dos elétrons pelos complexos enzimáticos respiratórios e ATP sintetase	49
Figura 10	Esquema estrutural da citocromo c oxidase	50
Figura 11	Esquema das reações primárias e secundárias, frente ao laser de baixa potência	53
Figura 12	Lei de Arndt Schultz	54
Figura 13	Dissecação do animal proposto pelo presente estudo	63
Figura 14	Laser Endophoton [®] , modelo LLT 0107, óculos de proteção e posicionamento da probe	64
Figura 15	Medidor de potência Pocket Power	65
Figura 16	Coleta de sangue e Espectrofotômetro Genesys	66
Figura 17	Microscópio Óptico Olympus BX50 associado ao tubo alongador e à câmera digital, acoplados ao computador	67
Figura 18	Interface de visualização do software Image-Pró Plus	68
Figura 19	Interface do algoritmo e metodologia adotada	69
Figura 20	Ultra-micrótomo digital e porta blocos e gradinhas	70
Figura 21	Microscópio eletrônico de transmissão	70

Figura 22	Número de adipócitos uniloculares para os respectivos grupos	72
Figura 23	Área dos adipócitos uniloculares para os respectivos grupos	73
Figura 24	Fotomicrografias de tecido adiposo unilocular de ratos	74
Figura 25	Glicerol plasmático pré e pós-laserterapia para os grupos	76
Figura 26	Número de adipócitos uniloculares para os respectivos grupos	77
Figura 27	Área dos adipócitos uniloculares para os respectivos grupos	78
Figura 28	Fotomicrografias de tecido adiposo unilocular de ratos	79
Figura 29	Eletromicrografia de adipocitos uniloculares de ratos	80
Figura 30	Eletromicrografia de célula adiposa unilocular de ratos	81

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

AC	adenilato ciclase
ADP	adenosina difosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AP	absorbância do padrão
ASP	acylation stimulating protein (proteína estimulante de ascilação)
At	absorbância do teste
ATP	adenosina trifosfato
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cu	Cobre
DG	Diglicerídeo
ERK	sinal extracelular regulado por quinases
eV	Eletronvolt
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FATP	fatty-acid transport protein (proteína transportadora de ácidos graxos)
g	Gramma
Ga-Al-As	arseneto de gálio aluminizado
Ga-As	arseneto de gálio
GI	Glicerol
HE	hematoxilina e eosina
HLLT	hight level laser therapy (terapia por laser de alta intensidade)
HSL	lipase hormônio sensível
Hz	Hertz
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
In-Ga-Al-P	índio gálio alumínio fósforo
J	Joule
J/cm ²	joule por centímetros quadrados

KLF15	kruppel like factor 15
Laser	light amplification by stimulated emission of radiation (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação)
LDL	low density lipoprotein (lipoproteínas de baixa densidade)
LED	light emitting diode (diodo emissor de luz)
LILT	low-level laser therapy (laserterapia de baixa intensidade)
M	Molar
m	10^{-3}
Maser	microwave amplification by stimulated emission of radiation (amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação)
MGL	monoglicerídeo lípase
MMP	metaloproteinase de matriz extracelular
MSG	Monosodium glutamate (glutamato monossódico)
n	Negativo
n	10^{-9}
Na	Sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
Ne-He	hélio Neônio
NO	óxido nítrico
NPY	neuropeptídeo Y
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ⁻	ânion superóxido
p	Positivo
PAI	plasminogen activator inhibitor (inibidor de plasminogênio ativado)
PCR	proteína c reativa
PKA	proteoquinase A
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
TG	Triglicerídeo
TNF	tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VLDL	very low density lipoprotein (lipoproteínas plasmáticas de densidade muito baixa)

W	Watt
Zn	zinco
β AR	receptor β adrenérgico
μ	10^{-6}

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES	13
CAPÍTULO 1	18
INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	20
1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO	21
CAPÍTULO 2	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 O TECIDO ADIPOSEO	22
2.1.1 Ultraestrutura, Morfologia e Aspectos Histológicos	23
2.1.2 Fisiologia	25
2.1.3 Adipocitocinas	31
2.1.4 Especificidades	33
2.2 LASER	34
2.2.1 Princípios físicos do Laser	35
2.2.2 Componentes do Laser	38
2.2.3 Características da Radiação Laser	40
2.2.4 Dosagem e parâmetros de irradiação	42
2.2.5 Laser de Semicondutor	43
2.2.6 Interação entre a Radiação Laser e os Tecidos Biológicos	44
2.2.7 Efeitos do Laser: Aspectos Moleculares e Celulares	51
2.2.8 Macroeifeitos Biológicos e Aplicações na Área da Saúde	56
CAPÍTULO 3	60
MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1 DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA – ESTUDOS PRELIMINARES	60
3.2 ESTUDO FINAL	62

3.2.1	Modelo experimental e cuidados gerais	62
3.2.2	Grupos experimentais e procedimentos básicos.....	63
3.2.3	Equipamento empregado.....	64
3.2.4	Aferição do equipamento	64
3.2.5	Procedimentos	65
3.2.6	Avaliação bioquímica	66
3.2.7	Microscopia óptica e eletrônica.....	67
3.2.8	Análise estatística	71
CAPÍTULO 4	72
RESULTADOS	72
4.1	AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA PRELIMINAR.....	72
4.2	ESTUDO FINAL.....	75
4.2.1	Massa dos animais	75
4.2.2	Resultados bioquímicos	76
4.2.3	Resultados histomorfométricos.....	77
4.2.4	Resultados ultraestruturais.....	79
CAPÍTULO 5	82
DISCUSSÃO	82
5.1	QUANTO AOS RESULTADOS.....	82
5.2	QUANTO AO MÉTODO.....	85
CAPÍTULO 6	92
CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 7	93
SUGESTÕES, PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE	106

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é responsável por uma série de funções essenciais para o adequado funcionamento do organismo, a saber: metabolização e secreção de compostos protéicos e não protéicos, absorção de choques mecânicos, reservatório energético, isolamento térmico, bem como preenchimento e auxílio na fixação dos órgãos e delineamento da superfície corporal. De modo geral, integra sinais provenientes de outros órgãos, exerce ações locais, periféricas e centrais e, em decorrência da sua função no controle da homeostase energética, pode influenciar negativamente outros sistemas, na vigência de alterações funcionais. Deste modo, trata-se de um órgão endócrino, envolvido em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Trayhurn e Beattie, 2001; Guirro e Guirro, 2002d; Rajala e Scherer, 2003; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Souza, Damasceno *et al.*, 2004; Krug e Ehrhart-Bornstein, 2005).

Em indivíduos com peso corpóreo dentro dos padrões de normalidade, o tecido adiposo corresponde a 20-25% e 15-20% nos sexos feminino e masculino, respectivamente (Vague, 1991; Garcia, Chaves *et al.*, 2002; Guirro e Guirro, 2002b). Porém, a distribuição da gordura não é uniforme. Algumas regiões nunca acumulam adiposidade, como a pálpebra e a cicatriz umbilical; e, em contrapartida, outras regiões acumulam-na em grandes quantidades, cabendo citar a porção proximal dos membros e a parede abdominal (Guirro e Guirro, 2002d; Geneser, 2003).

Quando há um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calóricos, o substrato de energia adicional é armazenado na forma de gordura (Trayhurn e Beattie, 2001; Cisternas, 2002; Garcia, Chaves *et al.*, 2002; Pereira, Francichi *et al.*, 2003; Delgado, 2005). Este tecido, diferentemente dos demais, apresenta uma acentuada capacidade de alterar seu tamanho, haja vista que em condições patológicas como obesidade e anorexia, o mesmo pode elevar seu peso total acima de 100%, ou diminuí-lo, chegando a 3% do normal (Vague, 1991; Trayhurn e Beattie, 2001).

Semelhante à distribuição, em termos de uniformidade, a mobilização dos lipídios ocorre em diferentes velocidades nos variados segmentos corporais. Os

adipócitos da região femoral, por exemplo, são metabolicamente mais estáveis e resistentes à lipólise, em relação aqueles localizados nos membros superiores (Jensen, 1997; Guirro e Guirro, 2002d). Este fato fundamenta-se pelo maior tamanho dos mesmos, pela influência dos hormônios sexuais femininos (Guirro e Guirro, 2002d), assim como por outras características intrínsecas deste tecido nas regiões citadas (Pitanguy *et al.*, 1987; Hermsdorff e Monteiro, 2004).

Segundo a *World Health Organization* (WHO, 2003), existem mais de um bilhão de indivíduos adultos acima do peso, e dentre eles, pelo menos trezentos milhões são clinicamente obesos. Além disso, grande parte dos indivíduos com peso dentro dos padrões de normalidade, ou mesmo com baixo peso, são acometidos por adiposidades localizadas e lipodistrofias de modo geral, com grandes repercussões estéticas, funcionais, circulatórias, psicológicas, dentre outras (Pitanguy *et al.*, 1987; Guirro e Guirro, 2002a).

Em complemento, a maior exposição do corpo nos dias atuais, a valorização excessiva da beleza, tal qual a associação do corpo à idéia de consumo (Russo, 2005), bem como a tendência a uma nova consciência da harmonia corporal, refletem conseqüências relacionadas à excessiva preocupação com as deformidades do contorno corpóreo (Garcia *et al.*, 2002; Russo, 2005).

No que tange às intervenções, diversas técnicas terapêuticas são utilizadas objetivando promover ou auxiliar a redução da adiposidade, sendo uma dessas a laserterapia de baixa intensidade. O termo Laser designa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação e consiste em um sistema baseado na mecânica quântica que dá origem a um feixe luminoso (Hecht, 2002; Baxter, 2003). Trata-se de uma radiação não-ionizante, monocromática, coerente e colimada que ao interagir com o tecido biológico gera processos fotobiológicos, os quais compreendem alterações bioelétricas, bioquímicas e bioenergéticas referentes à modulação da atividade tissular (Karu, 1999; Guirro e Guirro, 2002c; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003). Embora bastante utilizada, pouco se sabe a respeito dos efeitos de tal tecnologia no tecido adiposo (Brown *et al.*, 2004; Medrado *et al.*, 2006).

Tendo em vista a complexidade do tecido adiposo, há uma urgente necessidade de informações concernentes às ações específicas das diferentes técnicas empregadas no mesmo (Medrado *et al.*, 2006). No que tange à laserterapia de baixa intensidade, essa necessidade é incrementada, uma vez que os

parâmetros modulatórios são diversos e os efeitos proporcionados contraditórios, frente à variação da densidade energética. Não apenas os macroefeitos, mas também os efeitos moleculares e celulares são importantes, de modo a fornecer base para os primeiros.

Neira *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da laserterapia de baixa intensidade no tecido adiposo de humanos, em complemento à técnica de dermolipectomia. Os autores observaram a presença transitória de poros na membrana dos adipócitos e o conseqüente extravasamento da gordura intracelular para o meio extracelular nas células submetidas à estimulação proposta. Em contrapartida, Brown *et al.* (2004) não obtiveram resultados positivos, frente ao uso de tal técnica, no tecido adiposo de humanos, porcos ou mesmo em cultura de pré-adipócitos humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a influência do Laser de baixa intensidade (In-Ga-Al-P) no tecido adiposo de ratos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos compreenderam:

- (1) analisar comparativamente os efeitos das intervenções propostas sobre o glicerol plasmático;
- (2) avaliar histológica e morfometricamente o tecido adiposo dos animais pertencentes ao grupo submetido à irradiação Laser e ao grupo controle;
- (3) avaliar ultra-estruturalmente a célula adiposa dos animais pertencentes aos grupos experimental e controle e;

- (4) comparar os resultados histomorfométricos e ultraestruturais dos animais submetidos à irradiação Laser com os achados do grupo controle.

1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Inicialmente, no capítulo 1, são abordados de forma sucinta os principais assuntos referentes à realização da presente dissertação, de modo a expor o problema, justificar a seleção de tal tema e posicioná-lo dentro do contexto atual, assim como descrever os objetivos propostos. No capítulo 2, a revisão da literatura é descrita em dois subcapítulos. O primeiro, concernente ao tecido adiposo, a saber: anatomia, fisiologia, adipocitocinas e especificidades. E o segundo referente ao Laser, mais especificamente: aspectos históricos, princípios físicos, componentes e características gerais, interações com o tecido biológico, efeitos específicos a nível molecular, celular e tecidual e, por fim, aplicações na área da saúde. Após a revisão, no capítulo 3, os materiais e métodos são apresentados, tanto referentes aos estudos preliminares, de modo a alcançar a metodologia final, quanto relativos ao estudo final. No que tange ao último, são descritos: o modelo e os grupos experimentais, os cuidados básicos, o equipamento utilizado, bem como os procedimentos e as avaliações realizadas. O capítulo 4, por sua vez, discorre sobre os resultados obtidos, em termos gerais: os resultados do estudo histomorfométrico preliminar e os resultados bioquímicos, histomorfométricos e ultraestruturais evidenciados pelo estudo final. O capítulo 5 trata da discussão desses resultados, de modo a explicá-los, justificá-los e contextualizá-los em relação aos estudos teóricos e práticos descritos na literatura, assim como em relação ao próprio estudo em si. Por derradeiro, nos capítulos 6 e 7 as conclusões desta dissertação de mestrado e as sugestões para trabalhos futuros, bem como as considerações finais são apresentadas, respectivamente, seguidas pelos elementos pós-textuais.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O TECIDO ADIPOSEO

A tela subcutânea é um tipo especial de tecido conjuntivo. De modo sucinto, constitui uma associação frouxa de células que armazenam gordura, denominadas células adiposas ou adipócitos, com células do estroma vascularizado presas em uma matriz de fibras colágenas e reticulares. Células do leito vascular, fibroblastos e leucócitos também fazem parte deste tecido, embora ocupem um volume bastante diminuto (Garcia *et al.*, 2002).

Tortora *et al.* (2002) relataram que os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo constituem 98% de todas as reservas energéticas do organismo. Por serem hidrofóbicos e não exercerem pressão osmótica sobre as membranas celulares, são mais facilmente armazenados em relação ao glicogênio.

Há duas variedades de tecido adiposo, as quais diferem-se pela cor, quantidade, vascularização, atividade metabólica, número de organelas e distribuição no organismo, a saber: tecido adiposo unilocular, branco ou amarelo e tecido adiposo multilocular ou marrom. O primeiro é o tecido distribuído amplamente ao nível do subcutâneo e, em decorrência do acúmulo de carotenóides, apresenta variação da coloração entre o branco e o amarelo, justificando sua denominação. O tecido multilocular é especializado na produção de calor e, por outro lado, apresenta distribuição corpórea limitada. Sua coloração decorre da vascularização abundante, bem como do número elevado de mitocôndrias (Garcia *et al.*, 2002; Guirro e Guirro, 2002d).

2.1.1 Ultraestrutura, Morfologia e Aspectos Histológicos

O tecido adiposo unilocular é composto por células grandes, esféricas quando isoladas e poliédricas quando agrupadas (Garcia *et al.*, 2002; Geneser, 2003). Estas células apresentam gotas lipídicas, sendo uma principal, grande, responsável por empurrar o núcleo celular alongado contra a membrana citoplasmática, e as outras gotas menores (Geneser, 2003) (figura 1A). Essas gotas são envolvidas e estabilizadas por uma proteína estrutural denominada perilipina (Wolf, 2005). Importa ressaltar que as células adiposas multiloculares contêm inúmeras gotículas lipídicas, assim como os adipócitos uniloculares em desenvolvimento, ocorrendo, nos últimos, a posterior coalescência das mesmas em uma inclusão lipídica grande na célula madura (Garcia *et al.*, 2002) (figura 1B).

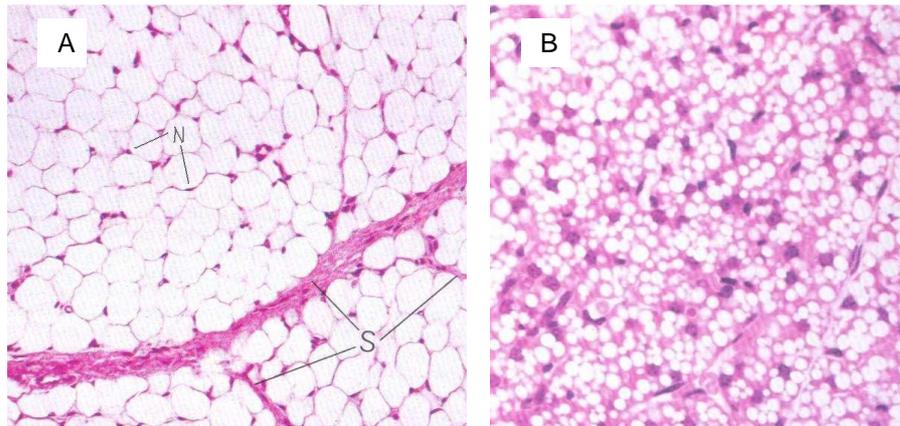


Figura 1. (A) Fotomicrografia de tecido adiposo unilocular corado com hematoxilina e eosina (HE). Cada espaço representa o local ocupado por uma só gota lipídica antes da sua dissolução durante a preparação do tecido. O material circundante representa o citoplasma das células adjacentes e algum tecido conjuntivo. S - septos mais espessos de tecido conjuntivo delimitando lóbulos de diferentes tamanhos. N - núcleo. (B) Fotomicrografia de tecido adiposo multilocular de um recém nascido, corado com HE, onde as células contêm gotículas adiposas de diferentes tamanhos. Figura adaptada de Rowrell *et al.* (1993).

Uma camada condensada de lipídios, reforçada por filamentos paralelos, constitui a interface entre a matriz citoplasmática hidrofílica e a gotícula de gordura hidrofóbica (Garcia *et al.*, 2002; Geneser, 2003). Segundo Williamson (1964) esses lipídios compreendem longas cadeias de ácidos graxos e fosfolipídios, orientados com a extremidade apolar para a fase lipídica, e com a região polar para a fase aquosa. Convém complementar que, internamente à interface, o vacúolo adiposo é

composto por triglicerídeos neutros, colesterol e ésteres de colesterol, unidos por forças de coesão de Van Der Waals. Neste sentido, uma linha elétron-densa separa estas duas bandas, com a presença de um envelope fenestrado na porção citoplasmática, e restos elétron-densos na extremidade lipídica (Cushman, 1970) (figura 2). A membrana citoplasmática, por sua vez, apresenta numerosas invaginações, denominadas vesículas de pinocitose, e externamente é envolta por glicoproteínas. O adipócito, conforme Cushman (1970), constitui-se de um extenso sistema de membranas. Relativamente às organelas, estas células apresentam poucas mitocôndrias, cisternas de retículo endoplasmático ocasionais, complexo de Golgi pequeno e uma quantidade moderada de ribossomos livres (Garcia *et al.*, 2002; Geneser, 2003).

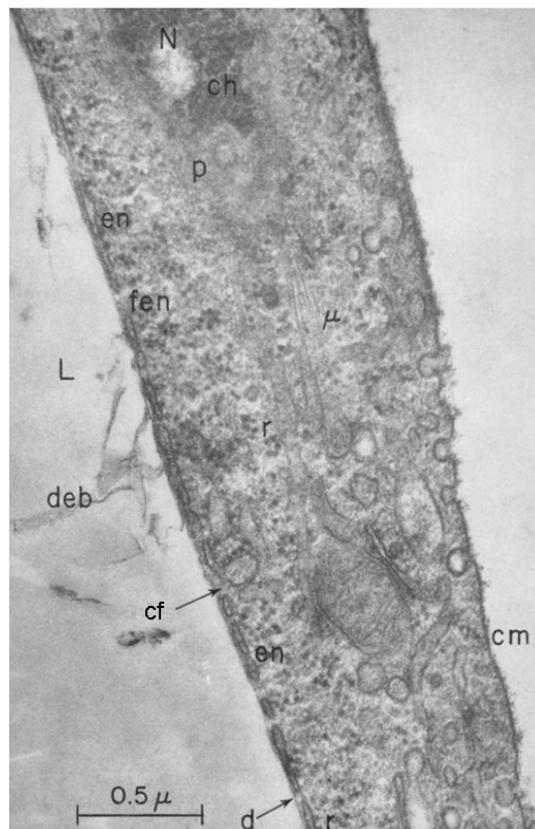


Figura 2. Eletromicrografia de célula adiposa unilocular. L – Gota lipídica central; cm – membrana citoplasmática; N – núcleo; ch – cromatina condensada; p – poro nuclear; μ - microtúbulo; en – envelope fenestrado; fen – fenestra; r – ribossomo; deb – restos elétron-densos; d – linha elétron-densa; cf – citoplasma na fenestra. Figura adaptada de Cushman (1970).

Este tecido, ainda, apresenta septos de tecido conjuntivo que contêm vasos, nervos, fibras colágenas e reticulares. A vascularização é muito abundante tendo em vista a pequena quantidade de citoplasma funcionante. Junqueira e Carneiro (2004) ressaltaram que a relação entre o volume de capilar sanguíneo e o volume citoplasmático é maior no tecido adiposo do que no músculo estriado. Lee e Pappone (1997) sugeriram que as membranas celulares das células adiposas uniloculares e multiloculares são acentuadamente semelhantes, no que tange às suas propriedades.

Ambos os tipos de tecido adiposo são inervados pelo sistema nervoso autônomo, mais especificamente pelas fibras simpáticas. No tecido unilocular, as terminações nervosas são encontradas apenas nas paredes dos vasos sanguíneos, logo, os adipócitos não são diretamente inervados (Hermsdorff e Monteiro, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004). Entretanto, Bartness e Bamshad (1998) e Trayhurn *et al.* (2001) referiram a presença de inervação simpática direta adjacente aos adipócitos, tendo em vista as relações entre este sistema e as concentrações de leptina. No tecido multilocular, por outro lado, as terminações nervosas simpáticas atingem diretamente as células adiposas (Hermsdorff e Monteiro, 2004).

2.1.2 Fisiologia

As principais ações metabólicas do tecido adiposo unilocular compreendem as atividades lipogênicas e lipolíticas. Os lipídios armazenados nas células adiposas são, principalmente, triglicerídeos ou ésteres de ácidos graxos e glicerol (Garcia, Chaves *et al.*, 2002; Tortora e Grabowski, 2002) e em menor quantidade o colesterol (Trayhurn e Beattie, 2001). Tais lipídios são provenientes da alimentação e carregados até as células adiposas como triglicerídeos a partir dos quilomícrons, oriundos do fígado e transportados até o tecido adiposo sob a forma de triglicerídeos constituintes das lipoproteínas plasmáticas de densidade muito baixa (VLDL), e da síntese nas próprias células adiposas, a partir da glicose (Garcia *et al.*, 2002; Tortora e Grabowski, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004).

Os quilomícrons são partículas formadas pelas células epiteliais do intestino delgado, a partir dos nutrientes absorvidos. São constituídos por triglicerídeos e

pequenas quantidades de colesterol, fosfolípidos, proteínas (Junqueira e Carneiro, 2004) e vitaminas lipossolúveis (Tortora e Grabowski, 2002). Após deixarem as células epiteliais, atingem a circulação sistêmica, por intermédio do sistema linfático e sangue venoso. Nos capilares sanguíneos do tecido adiposo, ocorre a hidrólise dos quilomícrons e das VLDL através da lipase lipoproteica, com conseqüente liberação de ácidos graxos e glicerol. Os mesmos são absorvidos pelos adipócitos e se difundem para o citoplasma, onde se recombina para formar novas moléculas de triglicerídeos, bem como pelas células musculares para produção de adenosina trifosfato (ATP) (Trayhurn e Beattie, 2001; Cisternas, 2002; Tortora e Grabowski, 2002; Bos *et al.*, 2005). Tortora *et al.* (2002) salientaram que após depositar parte de seus triglicerídeos nas células adiposas, as VLDL são convertidas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

A captação dos ácidos graxos pelo adipócito, em sua maior parte, ocorre por difusão facilitada através de proteínas transportadoras transmembrana. Dentre estas, destacam-se a CD36 e a proteína transportadora de ácidos graxos (FATP). Uma vez no citoplasma, o ácido graxo se liga a outra proteína de ligação, a FABP, que transporta a molécula para ser acilada com a coenzima A, através da acetilCoAsintetase. Na seqüência, por fim, o ácido graxo é transferido para a gotícula adiposa (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006).

O aumento de triglicerídeos e, conseqüentemente, da gotícula adiposa, promove hipertrofia adipocitária. Na presença de gordura em demasia, precursores de adipócitos são recrutados e na seqüência submetidos à diferenciação celular, culminando em aumento, em diferentes graus, deste tecido (Spiegelman e Flier, 2001; Chavey *et al.*, 2003).

Diversos fatores de transcrição estão envolvidos neste processo (Rosen *et al.*, 1999; Clausell e Tavares, 2004). O PPAR γ , um membro de uma família de receptores nucleares altamente expresso no tecido adiposo, tem papel crítico na regulação da diferenciação do adipócito, onde estimula a transcrição de muitos genes adipocíticos específicos, assim como o início da adipogênese (Rosen *et al.*, 1999). Outros fatores de transcrição envolvidos na diferenciação adipocitária compreendem os C/EBPs, membros da família b-zip (domínio básico de ligação do DNA) (Lekstrom-Himes e Xanthopoulos, 1988; Rosen *et al.*, 1999) e o KLF15, membro da família *Kruppel like factor* (Oishi *et al.*, 2005). Cabe relatar que os ácidos

graxos correspondem a um grupo de ativadores naturais desses receptores (Lee *et al.*, 2003).

Basicamente, a diferenciação adipocitária é caracterizada por mudanças cronológicas na expressão de numerosos genes, os quais refletem na aquisição do fenótipo de adipócito. Primariamente, a célula passa pelo estágio de estabilização do crescimento, seguido pelo estágio de mitoses pós-confluentes, expansão clonal e, nos estágios finais, a célula incrementa a lipogênese, adquire sensibilidade à insulina, aumenta o número total de receptores adrenérgicos e passa a sintetizar um número considerável de substâncias específicas de tal tecido (Gregoire *et al.*, 1998) (figura 3).

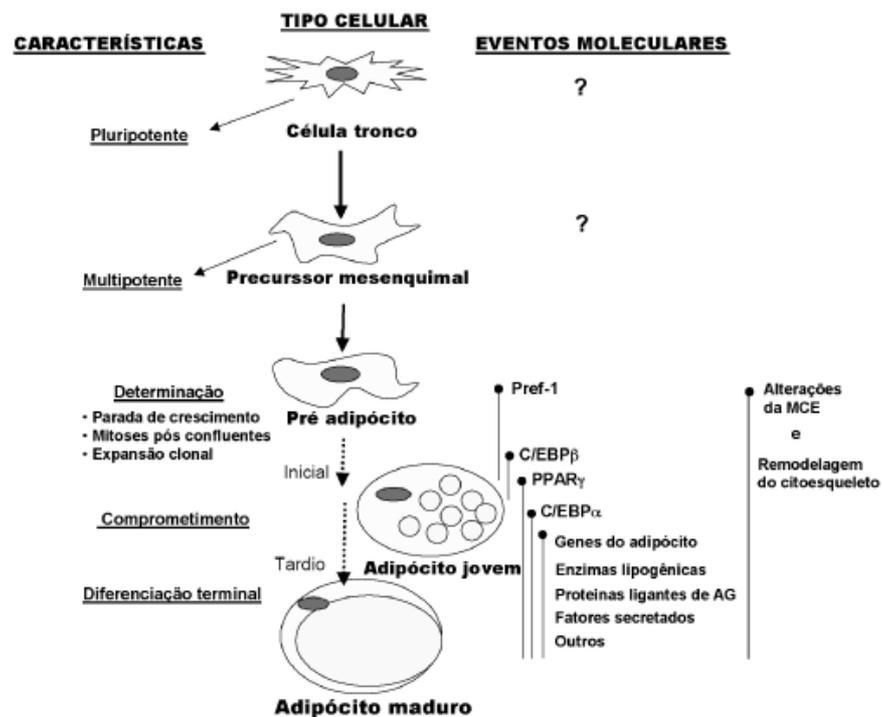


Figura 3. Estágios da diferenciação adipocitária. Precusores de células-tronco pluripotentes dão origem às células precursoras mesenquimais com potencial para diferenciação em osteoblastos, condroblastos, mioblastos e adipócitos. Moléculas seletivas acompanham este processo de diferenciação, com sua duração aproximada representada acima pela linha sólida. AG – ácidos graxos, MCE – matriz extracelular. Figura adaptada de Gregoire *et al.* (1998).

A lipólise ou hidrólise dos triglicerídeos é desencadeada por hormônios, neurotransmissores e outras moléculas efetoras (Arner, 1996; Cisternas, 2002; Holm, 2003; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Wolf, 2005). No caso das catecolaminas,

as mesmas são liberadas pelas terminações pós-ganglionares dos neurônios simpáticos do tecido adiposo, e agem via receptores adrenérgicos, mais especificamente β_1 , β_2 e β_3 , estimulando a lipase hormônio sensível e inibindo os adrenoceptores α_1 e a lipase lipoprotéica (Arner, 1996; Holm, 2003).

Em termos moleculares, a lipase hormônio sensível é uma proteína com larga especificidade ao substrato composta por dois grandes domínios, um domínio N-terminal e outro C-terminal. O último compreende o domínio catalítico, enquanto o domínio N-terminal, embora pouco compreendido, seja responsável pelas interações entre as diferentes proteínas bem como entre a proteína e lipídios (Holm, 2003).

A ligação entre os receptores adrenérgicos e os agonistas, acoplados ao adenilato ciclase via proteína G ativada, promove um incremento de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e a ativação da proteína quinase A (PKA), a qual fosforila a lipase hormônio sensível e a perilipina. Em continuidade, a lipase hormônio sensível fosforilada é translocada para a gotícula de gordura (Cisternas, 2002; Holm, 2003; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Wolf, 2005). Não apenas a proteína quinase, mas também a ERK 1 e 2 (sinal extracelular regulado por quinases) é ativada, via β_1 integrinas, estimulando em conjunto a lipólise (figura 4) (Farnier *et al.*, 2003; Holm, 2003). Farnier *et al.* (2003) obtiveram modificações funcionais adipocitárias, decorrentes das variações morfométricas celulares, por padrões de sinalização β_1 integrinas/ERKs.

Segundo Wolf (2005), a perilipina fosforilada possibilita a entrada da lipase hormônio sensível à gotícula adiposa, onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos e estes em monoglicerídeos. Além da lipase hormônio sensível, a desnutrina também é responsável pela conversão de triglicerídeos em diglicerídeos (Holm, 2003; Wolf, 2005). Dolinsky *et al.* (2004) citaram ainda a triglicerol hidrolase como proteína envolvida na hidrólise dos triglicerídeos adipocitários. Os monoglicerídeos são hidrolizados por outra enzima, denominada monoglicerídeo lipase e na seqüência, ocorre a liberação de ácidos graxos e glicerol que, por sua vez, difundem-se para os capilares do tecido adiposo. Os ácidos graxos, quase insolúveis na água, ligam-se à porção hidrofóbica da albumina do plasma sanguíneo e são transportados para outros tecidos onde serão utilizados como fonte de energia. O glicerol, em contraste, bastante solúvel no plasma, é captado pelo fígado e reaproveitado (Junqueira e Carneiro, 2004). Garcia *et al.* (2002) relataram que os

adipócitos uniloculares tornam-se multiloculares e diminuem de diâmetro à medida que mobilizam lipídios.

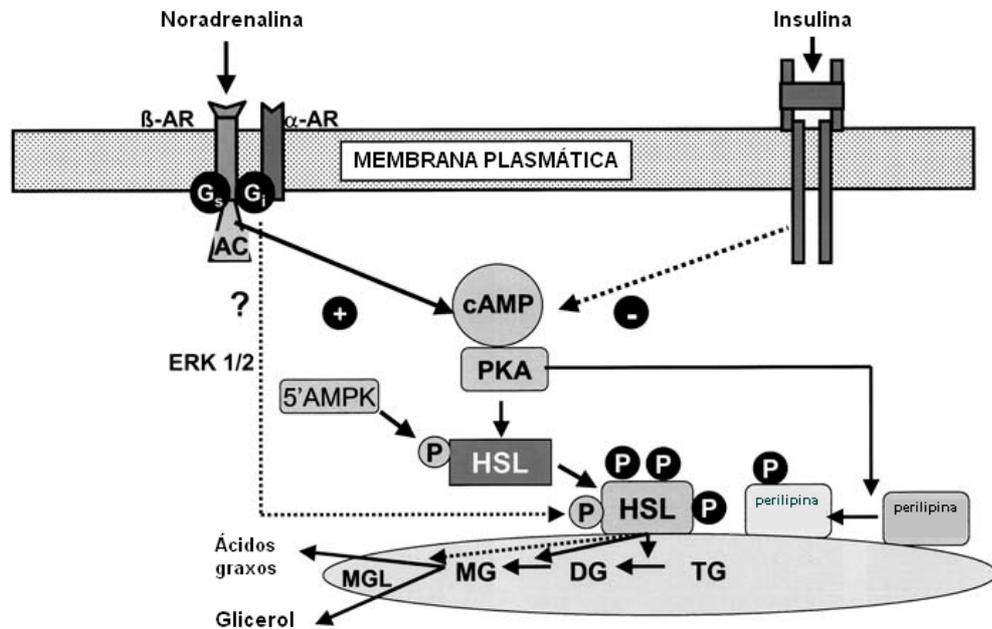


Figura 4. Lipólise adipocitária. A ligação de agonistas aos receptores β -adrenérgicos (β -AR), ligados à adenilato ciclase (AC) via Proteína G ativada (G_s), eleva os níveis de AMPc, que ativa a proteoquinase A (PKA), a qual fosforila: a lipase hormônio sensível (HSL) em três resíduos serina e, a perilipina A em múltiplos sítios. A HSL é então translocada para a gotícula de gordura, onde a perilipina fosforilada possibilita seu acesso. A HSL é, aparentemente, fosforilada em um quarto resíduo serina. Esse processo resulta na degradação dos triglicerídeos (TG) em diglicerídeos (DG), destes em monoglicerídeos e por fim, em ácidos graxos e glicerol com a participação da monoglicerídeo lipase (MGL). Figura adaptada de Holm (2003).

Importa citar que a perilipina regula tanto a lipólise quanto a lipogênese, por intermédio do controle do acesso à gotícula lipídica por parte das enzimas lipolíticas. Esta proteína, em condições basais, protege a gotícula adiposa da ação das enzimas citosólicas. Entretanto, quando fosforilada, permite o acesso das mesmas ao triglicerídeo intracelular (Wolf, 2005; Marcinkiewicz *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006). Marcinkiewicz *et al.* (2006) observaram que a fosforilação da perilipina A, pela serina492, desencadeia a fragmentação e a dispersão de tais gotas. A evidência da perilipina A junto aos fragmentos lipídicos mínimos sugere a participação de tal proteína no auxílio da reestruturação do triglicerídeo goticular. Os autores especularam ainda que essa fosforilação seja responsável pelo recrutamento de

moléculas responsáveis pela motilidade da gotícula, no processo de remodelação da mesma. Duas isoformas de perilipina são conhecidas: perilipina A e B, sendo a primeira dominante e responsável por envolver a gota adiposa (Marcinkiewicz *et al.*, 2006).

Segundo Gaudiot *et al.* (1998 e 2000), o óxido nítrico (NO) exerce um papel importante na modulação da lipólise adipocitária, tendo em vista seu estado redox. Large *et al.* (1998) e Mottagui-Tabar e Rydén *et al.* (2003), a partir de seus estudos, sugeriram que a expressão da lipase hormônio sensível mantém relação com a capacidade de estimulação catecolaminérgica, por parte das células adiposas, enquanto a expressão da perilipina mantém relação com a capacidade lipolítica basal. E Yamaguchi *et al.* (2006) consideraram a interação entre a CGI-58 endógena, distribuída nas gotículas de gordura e a perilipina como crítica no metabolismo lipídico intracelular.

De modo geral, a lipólise e a lipogênese são reguladas por hormônios de mesma natureza. A ativação da lipólise é resultante do aumento da concentração intracelular de AMPc, podendo ser mediada pela epinefrina e norepinefrina, cortisol, hormônios tireoideanos, glucagon e fatores de crescimento (Arner, 1996; Tortora e Grabowski, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004). Vale complementar que variações nas taxas de fluxo sanguíneo podem influenciar a atividade lipolítica (Arner, 1996). Quisth *et al.* (2005) demonstraram padrões diferenciados de regulação, por parte da noradrenalina, no tecido adiposo em relação ao músculo esquelético. O primeiro apresentou uma sensibilidade alta, porém, transitória a tal substância, tanto para a lipólise quanto para a alteração de fluxo sanguíneo. Vale citar que em termos lipolíticos, a sensibilidade apresentou-se pelo menos 100 vezes superior para o tecido adiposo em comparação ao músculo esquelético. A transitoriedade observada é justificada pela redução da sensibilidade dos receptores β adrenérgicos, em resposta à estimulação catecolaminérgica sustentada ou repetida (Arner *et al.*, 1991; Marion-Latard *et al.*, 2001). Semelhantemente a Quisth *et al.* (2005), que observaram variações nas taxas de fluxo sanguíneo do tecido adiposo frente ao incremento de noradrenalina, a saber: aumento seguido de redução; Marion-Latard *et al.* (2001) verificaram aumento do fluxo sanguíneo após infusão do tecido adiposo com norepinefrina e redução após infusão com terbutalina e dobutamina. Entretanto,

os autores não observaram variações no fluxo sanguíneo frente a tais infusões, antes e após a atividade física.

A insulina, por outro lado, é lipogênica (Tortora e Grabowski, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004), sendo sua atuação decorrente da inativação da lipase hormônio sensível a partir da fosfodiesterase, a qual degrada o AMPc (Holm, 2003; Wolf, 2005).

Diversos autores relataram que as interações entre as diferentes células adiposas e entre os adipócitos e a matriz extracelular são bastante importantes para os processos envolvendo tal tecido (Nakajima *et al.*, 1998; Chavey *et al.*, 2003; Kawagushi *et al.*, 2003). Chavey *et al.* (2003) concluíram que as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) modulam a diferenciação adipocitária em estágios iniciais e Thckonia *et al.* (2005) observaram a adipogênese na ausência de contato entre os adipócitos, sugerindo que tal interação não é necessária para o aumento do tecido adiposo.

2.1.3 Adipocitocinas

O tecido adiposo sintetiza diversas moléculas denominadas adipocinas ou adipocitocinas, as quais conferem a função de regulação do metabolismo corpóreo a tal tecido (Trayhurn e Beattie, 2001; Garcia *et al.*, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Krug e Ehrhart-Bornstein, 2005). Essas substâncias, em sua grande maioria, estão relacionadas aos processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, diabetes não insulino-dependente, dislipidemias, obesidade, além do próprio controle intrínseco do tecido em questão. Dentre elas, destacam-se o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), proteína C reativa (PCR), resistina, proteína estimulante de ascilação (ASP), leptina, adiponectina e fatores envolvidos no sistema renina-angiotensina (Trayhurn e Beattie, 2001; Cisternas, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004).

O TNF- α é uma citocina que age diretamente no adipócito, promovendo indução da apoptose, inibição da lipogênese via inibição da expressão da lipase lipoprotéica, do GLUT-4 e da acetil Coa sintetase, bem como aumento da lipólise. A

IL-6, por estimular a lipólise independentemente da modulação de catecolaminas, glucagon e insulina, é um fator importante no metabolismo lipídico (Hermsdorff e Monteiro, 2004). A ASP e o fator de transcrição ativado por ligantes – γ (PPAR – γ), por outro lado, inibem a lipólise e estimulam a lipogênese, e a angiotensina II estimula igualmente a lipogênese, bem como a diferenciação dos adipócitos. A adiponectina, por sua vez, é uma proteína expressa exclusivamente nos adipócitos diferenciados, responsável por regular a sensibilidade à insulina, e conseqüentemente melhorar o controle dos níveis séricos de glicose, ácidos graxos livres e triglicerídeos (Cisternas, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004).

A leptina, descoberta em 1994 por Friedman *et al.* (Zhang *et al.*, 1994) é sintetizada, principalmente, pelo tecido adiposo branco e exerce efeitos primordiais na regulação do balanço energético de acordo com a gordura corpórea. Como ação primária, atua sobre os neurônios do núcleo hipotalâmico arqueado, onde estimula a expressão de neurotransmissores e hormônios ligados aos mecanismos de inibição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético total, via ativação do sistema nervoso simpático. Ao mesmo tempo, inibe a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo agouti, considerados orexígenos (estimuladores da fome). A leptina, ainda, pode ativar a adenosina ciclase, aumentando a oxidação lipídica, assim como suprimir a atividade da esteroil-CoA dessaturase, reduzindo a síntese de triglicerídeos. Sua expressão varia com o tamanho do adipócito e massa adiposa total (Trayhurn e Beattie, 2001; Cisternas, 2002; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Delgado, 2005; Krug e Ehrhart-Bornstein, 2005). Sendo assim, um maior grau de supressão da produção de leptina é decorrente da liberação de catecolaminas, sendo esta mediada primariamente através dos β_3 adrenorreceptores (Trayhurn *et al.*, 1995; Trayhurn e Beattie, 2001). Trayhurn *et al.* (1998) afirmaram que o sistema nervoso simpático, através de um mecanismo de *feedback* negativo, é o principal regulador fisiológico da produção de leptina.

Rodríguez *et al.* (2003) obtiveram um aumento da taxa lipolítica, frente a incrementos de leptina, em adipócitos de ratos *in vitro*, sendo esta mais pronunciada em altas concentrações de tal substância. Os autores não observaram diferenças na lipólise ao comparar diferentes locais de depósito adiposo (subcutâneo, epididimal e perirenal) em ratos de diferentes idades. Tais resultados sugerem que as alterações

no metabolismo da leptina, decorrentes do envelhecimento, podem afetar o hipotálamo e os receptores para a mesma de modo diferenciado.

Novos compostos, relativos ao tecido adiposo, foram caracterizados recentemente, o que em associação às adipocinas já citadas evidenciam a alta complexidade de tal tecido (Kersten *et al.*, 2000; Krug e Ehrhart-Bornstein, 2005).

2.1.4 Especificidades

Segundo Trayhurn e Beattie (2001) e Hermsdorff e Monteiro (2004), o tecido adiposo branco é um órgão homogêneo, com diferenças básicas entre seus diversos locais de depósito. Uma delas refere-se às sensibilidades específicas frente às diversas substâncias reguladoras do metabolismo do tecido adiposo. O depósito visceral é o mais ativo metabolicamente, haja vista sua alta sensibilidade à ação lipolítica das catecolaminas nos β -adrenorreceptores. Os α_2 -adrenorreceptores são mais ativos no tecido adiposo subcutâneo glúteo-femoral em relação ao abdominal. E enquanto os receptores β_1 e β_2 adrenérgicos estão bem reduzidos no tecido adiposo subcutâneo glúteo-femoral, β_2 está bem ativo no tecido subcutâneo abdominal, indicando que o último é mais lipolítico em relação ao primeiro (Hermsdorff e Monteiro, 2004).

Louis *et al.* (2000) evidenciaram, em seus estudos, um papel mais intenso dos adrenoceptores β_1 na estimulação lipolítica em baixas concentrações de agonistas específicos. Contudo, em altas concentrações destas substâncias, os autores observaram o efeito dominante dos receptores adrenérgicos β_3 e, tendo em vista a magnitude da resposta, os mesmos sugerem que a lipólise máxima pode ser induzida exclusivamente por tais receptores. Por outro lado, não foi observado papel direto mediado pelos β_2 adrenoceptores na indução lipolítica.

Mauriége *et al.* (2000) e Hermsdorff e Monteiro (2004) relataram que em mulheres com idade fértil, a ação da lipase hormônio sensível, via ativação catecolaminérgica, é aumentada no tecido adiposo subcutâneo abdominal em comparação ao glúteo-femoral. Entretanto, em mulheres climatéricas, a lipase hormônio sensível tem atividade reduzida, o que em associação a outros fatores

pode justificar o maior acúmulo de adiposidade abdominal bem como a redistribuição da composição corpórea em mulheres acima de 50 anos.

O tecido adiposo multilocular tem como função primordial a produção de calor. Ao ser estimulado pela liberação de noradrenalina, o mesmo acelera a lipólise e a oxidação dos ácidos graxos, a qual produz calor e não ATP. Este processo decorre da termogenina, uma proteína transmembrana das mitocôndrias, que permite a volta para a matriz mitocondrial dos prótons transportados para o espaço intermembranoso, sem passar pelo sistema ATP sintetase. Conseqüentemente, a energia gerada pelo fluxo de prótons não é usada para sintetizar ATP, sendo dissipada como calor (Garcia *et al.*, 2002).

Segundo Lee e Pappone (1997), o ATP funciona como regulador da exocitose e da secreção de substâncias por parte das células adiposas. Os autores observaram, em seus estudos, uma corrente de despolarização e incrementos na capacitância, frente à exposição dos adipócitos uniloculares ao ATP extracelular.

2.2 LASER

O termo Laser é um acrônimo para amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Esse princípio foi originalmente postulado por Albert Einstein, em 1916, a partir da Lei de Radiação de Planck, a qual se refere à emitância espectral ou energia por unidade de área e unidade de tempo para cada comprimento de onda. Baseados no princípio de Einstein, Townes, Gordon e Zeiger desenvolveram um aparelho conhecido como MASER ou amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação, dependente diretamente da interação quântica entre a matéria e a energia radiante (Kahn, 1994; Low e Reed, 2001; Hecht, 2002; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003).

Em 1958, Townes e Schalow expuseram as condições físicas gerais a serem verificadas para o desenvolvimento do amplificador de luz por emissão estimulada de radiação e, em 1960, Theodore Maiman produziu o primeiro Laser utilizando o cristal de Rubi nos EUA, o que segundo Hecht (2002) é certamente um dos grandes marcos da história da óptica. No ano seguinte, Bennett e Herriott desenvolveram o Laser gasoso contínuo de hélio-neônio (He-Ne), sendo esta a primeira fonte de luz

coerente disponível comercialmente. Os Lasers de semicondutores, por sua vez, foram desenvolvidos em 1962, pouco depois dos diodos emissores de luz (LEDs). Os primeiros equipamentos eram constituídos de um único material, arseneto de gálio (Ga-As), convenientemente dopado de modo a constituir uma junção p-n, com funcionamento em regime pulsado na presença de temperaturas criogênicas, tendo em vista o alto calor dissipado (Hecht, 2002). Os estudos se voltaram à redução do limiar de funcionamento dos Lasers de diodo e nas décadas subseqüentes, diversos dispositivos foram produzidos, para fins comerciais, vale citar o próprio Laser de As-Ga, o Laser de arseneto de gálio alumínio (Ga-Al-As) e o Laser de índio-gálio-alumínio-fósforo (In-Ga-Al-P) (Low e Reed, 2001; Hecht, 2002; Baxter, 2003).

Desde a sua concepção, os Lasers encontraram aplicações imediatas e diversas na medicina, em particular na cirurgia oftálmica, onde os especialistas obtiveram sucesso no tratamento do descolamento da retina frente ao uso do Laser de rubi. De modo geral, até o final de década de 60, grande parte das aplicações do Laser objetivavam seus efeitos ablativos e fototérmicos, sendo esta denominada *high reactive-level laser treatment* (HLLT), ou terapia por Laser de alta intensidade. A partir disso, as aplicações não-térmicas de tal equipamento passaram a ser empregadas. Isso em decorrência do trabalho desenvolvido pelo grupo do professor Endre Mester, em Budapeste, que evidenciou um grande potencial para fotomodulação frente à irradiação tecidual por Laser de intensidade relativamente baixa (Colls, 1984). Vale citar que nos últimos 18 anos, a introdução de pequenos fotodiodos compactos para emissão do Laser produziu um aumento no uso desta terapia, conhecida como *low-level laser therapy* (LILT) ou laserterapia de baixa intensidade (Colls, 1984; Baxter, 2003). Segundo Baxter (2003) esse é um termo genérico e caracteriza a utilização de Lasers com potências inferiores a 500 mW e fluências inferiores a 35 J/cm².

2.2.1 Princípios físicos do Laser

As interações dos átomos com campos de radiação foram descritas por Einstein, em 1916 e 1917. Este trabalho compreende o ponto de partida para a adequada compreensão do funcionamento do Laser. Elas ocorrem por três

mecanismos básicos, a saber: emissão espontânea, emissão estimulada e absorção estimulada de radiação (Eisberg e Resnick, 1979; Hecht, 2002; Baxter, 2003).

Segundo a teoria quântica, os elétrons podem ocupar camadas específicas em torno do núcleo do átomo. A camada basal de cada elétron, em termos energéticos denominada E1, corresponde ao estado de energia de base, na qual há equilíbrio entre as forças do átomo. Vale citar que a passagem de um nível de energia para outro é conhecida como transição, e exige ganhar ou perder a diferença exata de energia existente entre tais níveis (Hecht, 2002; Baxter, 2003).

Os elétrons localizados na órbita de valência são mais facilmente afetados por fatores externos, logo, ao fornecer energia adicional ao átomo, os mesmos podem ocupar níveis de energia mais altos E_n . Este processo é denominado absorção estimulada de radiação (figura 5A) e caracteriza o estado de excitação a partir do estado fundamental (Eisberg e Resnick, 1979; Low e Reed, 2001; Kleppner, 2005).

Uma vez num estado de energia mais elevado, os elétrons tendem a retornar a um nível energético mais baixo ou fundamental, visto que o primeiro é instável, sendo a energia adicional liberada através da emissão de um fóton de radiação de mesma energia que a absorvida. Todavia, o tempo e a direção são aleatórios. Esse fenômeno é denominado emissão espontânea de radiação (figura 5B), onde a transição pode ser de modo direto ou indireto. Cabe citar que o tempo de permanência dos elétrons no nível E_n pode ser muito curto, da ordem de 10^{-8} s aproximadamente (Low e Reed, 2001; Hecht, 2002; Baxter, 2003; Kleppner, 2005).

O tempo de permanência do átomo num dado nível de energia é determinado pelo seu tempo de vida no mesmo. Um átomo excitado no nível E_n tem duas reações espontâneas possíveis, mover-se para o nível E1 ou deslocar-se para um nível intermediário E' . Neste último nível, os elétrons não podem sair facilmente de forma espontânea, sendo necessário liberar sua energia por outros meios. Logo, o tempo de permanência do elétron no mesmo é maior, da ordem de 10^{-3} s. Importa relatar que este estado é denominado metaestável (Low e Reed, 2001; Hecht, 2002).

Quando um fóton de energia ressonante perturba um elétron em um estado de energia mais alto, este move-se para um nível mais baixo, com uma diferença que corresponde à energia do fóton estimulador, e emite um fóton com as mesmas

características do incidente, mais especificamente energia, direção e fase. Esse processo é denominado emissão estimulada de radiação. O resultado corresponde a dois fótons idênticos que emergem do átomo perturbado, logo, um processo de amplificação estimulada (figura 5C). Vale ressaltar que esse processo é crucial para a operação do Laser (Eisberg e Resnick, 1979; Low e Reed, 2001; Hecht, 2002; Kleppner, 2005).

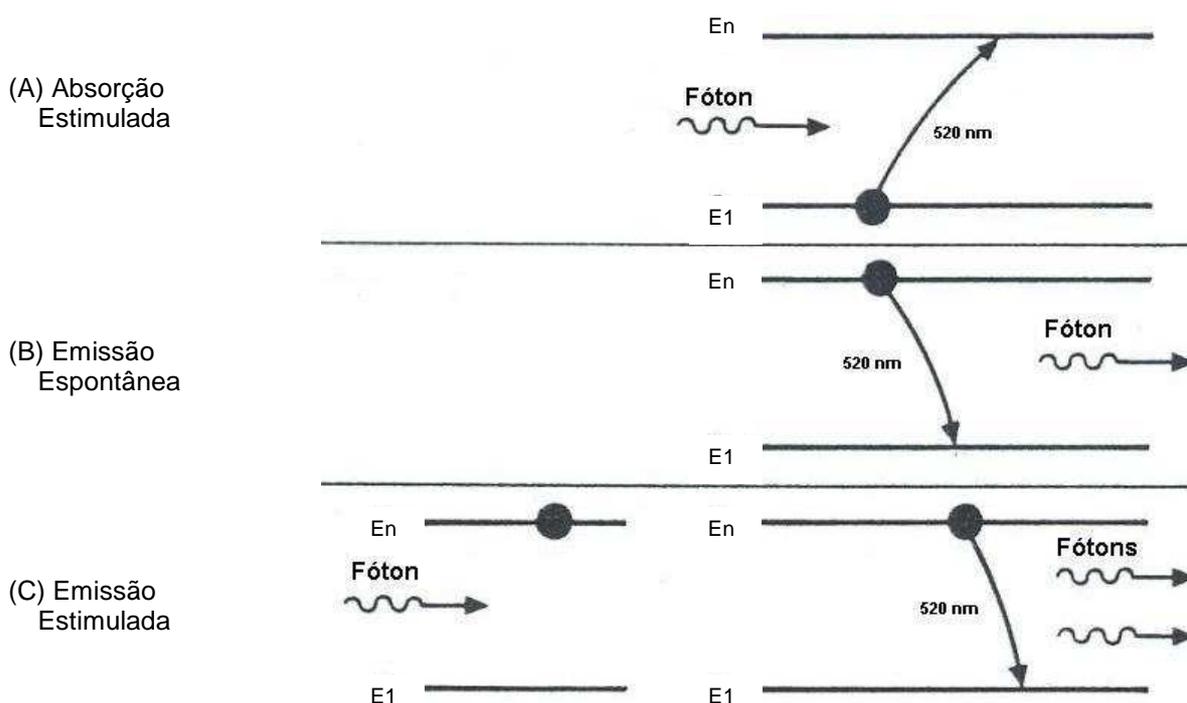


Figura 5. (A) Transição do elétron do estado fundamental para o estado de excitação ($E_1 - E_n$); (B) Retorno do elétron para o estado fundamental espontaneamente com a liberação de um fóton; (C) Emissão estimulada de radiação. Figura adaptada de Colls (1987).

Um grande número de átomos com elétrons no seu estado excitado pode levar à amplificação desde que um fóton libere um segundo e esses dois possam liberar mais dois e assim por diante. Deste modo, ter mais átomos no estado de energia mais alto em relação aos átomos em níveis inferiores ou basais é importante. Essa situação é denominada *inversão de população* e pode ser obtida forçando os elétrons de muitos átomos dentro do seu estado metaestável ou nível E' (Low e Reed, 2001).

As taxas de emissão espontânea e estimulada de radiação são caracterizadas pelos coeficientes A e B de Einstein, sendo a última proporcional à

taxa de absorção (Colls, 1984; Kleppner, 2005). A emissão espontânea é diretamente proporcional ao coeficiente A e ao número de átomos no estado E_n . A emissão estimulada, por sua vez, é diretamente proporcional ao coeficiente B, ao número de átomos no estado E_n e à densidade de fótons no campo de radiação. A absorção, para finalizar, é diretamente proporcional à constante B, à densidade de fótons e ao número de átomos correspondentes ao estado E_1 (Hecht, 2002; Kleppner, 2005).

Importa ressaltar que os três processos descritos, mais especificamente emissão espontânea, absorção e emissão estimulada de radiação ocorrem simultaneamente, entretanto, em proporções diferentes (Eisberg e Resnick, 1979).

2.2.2 Componentes do Laser

Um Laser é constituído, basicamente por três componentes essenciais: (1) um meio ativo, (2) um mecanismo de bombeamento ou fonte de potência e (3) um esquema de realimentação ou cavidade ressonante (Eisberg e Resnick, 1979; Colls, 1984; Baxter, 1995; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003).

O meio ativo é caracterizado por materiais em estado sólido, líquido ou gasoso, compostos por um grande número de átomos, moléculas ou íons a serem excitados a estados de energia mais altos (Baxter, 2003). No que tange à laserterapia de baixa intensidade, os meios mais importantes são os gases, Laser de He-Ne com 632,8 nm de comprimento de onda; e os semicondutores, Laser de Ga-As com 904 nm, Laser de Ga-Al-As com comprimento de onda entre 780 e 890 nm (Baxter, 1995; Túner e Hode, 2004) e o Laser de In-Ga-Al-P com comprimento de onda entre 630 e 700 nm (Túner e Hode, 2004). O princípio eletrônico da polarização de uma junção p-n (positivo-negativa) é responsável pela produção dos fótons nos Lasers de semicondutores. Cabe salientar que estes Lasers são especialmente adequados para utilização na área da saúde uma vez que são diminutos, eficientes, resistentes, práticos, de baixo custo e fáceis de serem produzidos em grande escala (Hatakoshi *et al.*, 1991; Baxter, 1995; Hecht, 2002; Baxter, 2003). Neste aspecto, Túner e Hode (2004) e Hatakoshi *et al.* (1991)

relataram que o Laser de He-Ne vem sendo gradualmente substituído pelo Laser de In-Ga-Al-P.

O mecanismo de bombeamento é responsável pela excitação dos átomos e inversão de população do meio Laser. Como já descrito, os átomos são excitados para um estado metaestável E' , os quais decaem para o nível E_n sem emitir radiação (transição não radiativa), permanecendo, deste modo, maior tempo em níveis elevados (Hecht, 2002; Baxter, 2003). Comumente, os dispositivos terapêuticos tendem a ser supridos pela rede elétrica, entretanto, unidades recarregáveis e operadas à bateria têm sido produzidas, recentemente, de modo a tornar tal equipamento portátil (Baxter, 2003). Além destes, outros mecanismos são utilizados para o bombeamento, como radiação óptica, ondas de rádio, microondas e reações químicas (Baxter, 1995; Túner e Hode, 2004).

A cavidade ressonante, por sua vez, consiste em uma estrutura que contém o meio ativo e incorpora um par de superfícies refletoras paralelas ou espelhos, alinhados nas extremidades da cavidade, sendo um totalmente refletor e o outro parcialmente refletor. Dentro dessa câmara, os fótons de luz produzidos são refletidos para trás e para frente entre os espelhos, aumentando, deste modo, a eficiência da geração de fótons pela emissão estimulada (Colls, 1984; Baxter, 2003). Cabe salientar que a distância entre os dois espelhos é um múltiplo exato do comprimento de onda do fóton, de modo que as ondas refletidas têm mesma fase que as ondas incidentes, resultando em interferência construtiva. A cavidade ressonante para uma unidade de He-Ne, geralmente é grande, sendo tal Laser considerado de primeira geração. Por outro lado, para as unidades que utilizam diodos, as cavidades são diminutas e constituem o próprio meio ativo. Estes, segundo Baxter (2003) são considerados de segunda geração. Além disso, muitos diodos podem ser incorporados em coleções de múltiplas fontes, os quais são denominados Lasers de terceira geração.

2.2.3 Características da Radiação Laser

O Laser terapêutico é uma radiação não-ionizante, monocromática, colimada e coerente, além de outras características, sendo algumas destas específicas e responsáveis por diferenciar tal radiação daquelas produzidas por fontes similares (Low e Reed, 2001; Baxter, 2003).

A monocromaticidade, como o próprio nome já diz, refere-se ao fato da radiação emitida estar situada em um mesmo comprimento de onda. É uma variável crítica na determinação dos efeitos terapêuticos, uma vez que determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente (Low e Reed, 2001; Baxter, 2003). No que tange ao espectro eletromagnético, as radiações Lasers compreendem àquelas pertencentes à faixa do infravermelho, espectro visível e ultravioleta (Colls, 1984; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003). Além destas, tal espectro abrange os raios X, raios Gama e os raios Cósmicos, com comprimentos de onda inferiores à radiação Laser, assim como microondas e as ondas de rádio com comprimentos de onda superiores (figura 6) (Colls, 1984).

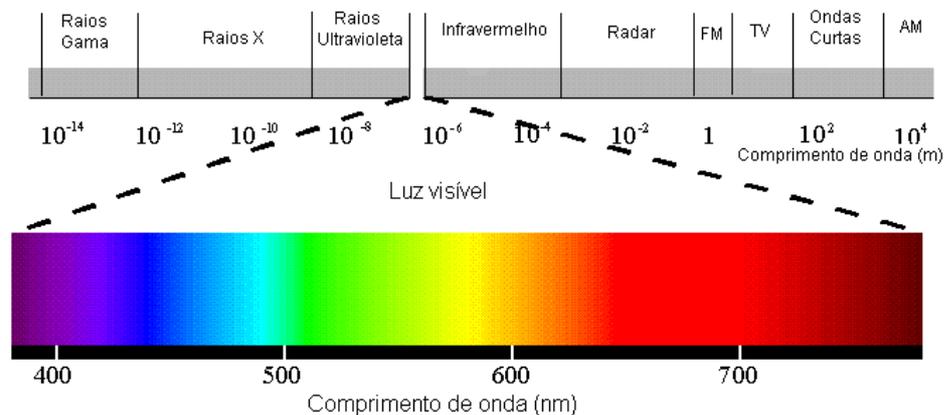


Figura 6. Espectro Eletromagnético. Figura adaptada de SIC (2001). Disponível em: www.satimagingcorp.com/characterization-of-satellite-remote-sensing-systems.html

O comprimento de onda mantém uma relação inversamente proporcional à frequência, uma vez que o produto das duas variáveis corresponde à velocidade da luz. Vale citar, segundo Colls (1984), Baxter (2003) e Nussbaum *et al.* (2003), que a energia quântica, mensurada em elétronvolts – eV para um determinado fóton de

luz, é inversamente proporcional ao comprimento de onda, haja vista a relação diretamente proporcional entre a energia fotônica, a frequência da radiação e a constante de Planck (equação 1).

$$E = h \times f \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

E = Energia quântica (eV)

f = Frequência da radiação (Hz)

h = Constante de Planck

Além do comprimento de onda ser específico, as ondas de luz são sincrônicas, haja vista que apresentam a mesma fase. Esta característica é denominada coerência. Mais especificamente, coerência temporal quando os picos e depressões dos campos eletromagnéticos se combinam perfeitamente no tempo, e coerência espacial quando apresentam mesma direção ou se equivalem no espaço (Colls, 1984; Low e Reed, 2001; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003). Schindl *et al.* (2000) e Nussbaum *et al.* (2003) relataram que tal propriedade é perdida durante a passagem do feixe luminoso pelos diferentes tecidos. E Karu (1987) referiu-se a inexistência de diferenças nas respostas biológicas frente à irradiação tissular com luz coerente e luz não coerente.

A colimação, por sua vez, compreende a propriedade de manter a potência óptica da radiação agrupada dentro de uma área relativamente pequena em distâncias variáveis. Com isso, a divergência é quase ausente (Baxter, 2003). Hecht (2002) ressaltou que a manutenção e o reforço do feixe de luz axial na cavidade ressonante é o responsável por tal propriedade. O ângulo de divergência depende do tamanho da abertura e das dimensões da cavidade ressonante. Em geral, a divergência aumenta com orifícios estreitos e longos comprimentos de onda (Nussbaum *et al.*, 2003). Cabe mencionar que os diodo Lasers são ordinariamente mais divergentes em relação aos Lasers de gás, razão pela qual utilizam-se os colimadores ópticos (Túner e Hode, 2004).

Segundo Nussbaum *et al.* (2003), o formato do feixe incidente, para o Laser que utiliza um semiconductor como meio ativo, é elíptico e com um padrão de distribuição complexo, quando relacionado aos Lasers de gás, os quais apresentam

cerca de 80% da energia concentrada no eixo central do feixe luminoso. Contudo, a desigualdade na distribuição do feixe, para os Lasers de semicondutores, não proporciona limitações clínicas quando aplicados pontualmente em contato com a pele.

2.2.4 Dosagem e parâmetros de irradiação

A potência de saída é expressa em watts (W) ou miliwatts (mW), podendo ser fixa ou de modo a permitir a escolha da porcentagem da mesma. A irradiância, também chamada de densidade de potência, é caracterizada pelo quociente da potência de saída, ou potência média de saída para uma unidade pulsada, pela área de secção transversal, sendo comumente expressa em mW/cm^2 (Baxter, 2003).

Alguns equipamentos Laser permitem pulsação de saída (Baxter, 2003). Nestes casos, a potência média deve ser diferenciada do valor do pico de potência. Vale dizer que o último é o pico de cada pulso. Já a potência média, por outro lado, é dependente da duração e da frequência do pulso (Low e Reed, 2001).

A polarização, assim como a coerência, é resultante dos efeitos da emissão estimulada. Contudo, em decorrência da dispersão, a mesma é perdida. E como os cromóforos são orientados ao acaso, o grau de polarização do feixe de luz não apresenta importância clínica (Nussbaum *et al.*, 2003).

A energia, por sua vez, compreende o produto da potência de saída pelo tempo de irradiação em segundos, sendo expressa em joules (J) (equação 2) (Colls, 1984; Low e Reed, 2001; Baxter, 2003).

$$E = P \times t \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

E = Energia (J)

P = Potência (W)

t = Tempo (s)

A densidade de energia é caracterizada pelo quociente entre a energia emitida e a área de tratamento, geralmente em centímetros, sendo, portanto, expressa em J/cm^2 (equação 3) (Colls, 1984; Low e Reed, 2001; Baxter, 2003).

$$S = E \times A^{-1} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

S = Densidade de energia (J/cm²)

E = Energia (J)

A = Área (cm²)

2.2.5 Laser de Semicondutor

O meio ativo deste tipo de Laser consiste em cristais com elevada concentração de impurezas, dopantes, formando uma junção p-n doadora de elétrons na zona n e receptora na zona p. O material de base pode ou não ser o mesmo para ambas as zonas, constituindo os arranjos denominados homojunção ou heterojunção respectivamente (figura 7). Ao aplicar uma tensão elétrica, polarizando diretamente a junção p-n, uma região estreita é criada em torno da mesma, onde se produz inversão de população. A polarização direta produz uma corrente elétrica que se traduz na passagem de elétrons à zona p e de lacunas à zona n, deste modo, a radiação luminosa é produzida por recombinações entre os elétrons e as lacunas na zona de junção, através da emissão espontânea e estimulada (Baxter, 1995; Hecht, 2002; Lang, 2002). Lang (2002), em termos complementares, citou também a presença de recombinações não radioativas, as quais reduzem a performance do laser. Segundo Hecht (2002), esse processo radiativo, concorrente com os mecanismos de absorção, torna-se dominante quando o volume de recombinação de cargas é reduzido e a corrente elevada. Interessa mencionar que o comprimento de onda é dependente do salto energético entre a banda de valência e a banda de condução (Baxter, 1995).

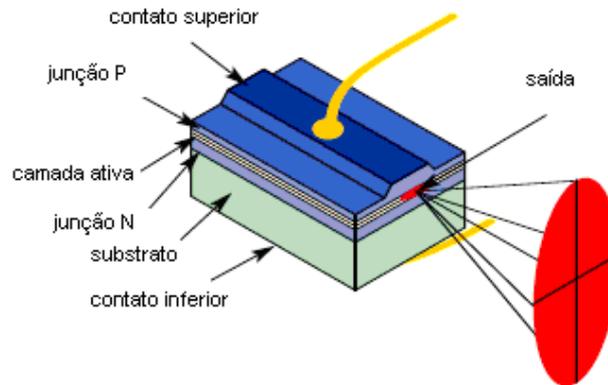


Figura 7. Composição básica de um diodo Laser. Figura adaptada de Lang (2002).

2.2.6 Interação entre a Radiação Laser e os Tecidos Biológicos

Segundo Baxter (2003) e Guirro e Guirro (2002c), os efeitos dos Lasers nos tecidos biológicos estão relacionados com a potência emitida, o comprimento de onda, o regime de pulso bem como com a energia absorvida. Na laserterapia de alta intensidade, os efeitos são aqueles referentes ao incremento da temperatura, portanto, reações fototérmicas, incluindo vaporização, coagulação, ablação e explosão. Tendo em vista os propósitos do presente estudo, a laserterapia de alta potência não será abordada.

No que tange à laserterapia de baixa intensidade, Baxter (1995) e Low e Reed (2001) consideraram que o feixe luminoso pode ser refletido na superfície do estrato ou penetrar no mesmo em proporções dependentes do comprimento de onda, da natureza da superfície tecidual e do ângulo e incidência. Os efeitos compreendem as reações atérmicas da radiação com o tecido. Levando em consideração essas duas variáveis, basicamente, a interação é dependente de alguns processos, do ponto de vista da óptica geométrica e da óptica quântica, a saber: reflexão, refração, transmissão, difusão, espalhamento e absorção (Colls, 1984; Schindl *et al.*, 2000; Tipler, 2000; Guirro e Guirro, 2002c). Baxter (1995) considerou a absorção e o espalhamento os principais mecanismos envolvidos na interação do fóton com o tecido.

A reflexão corresponde a uma mudança no sentido da propagação do feixe luminoso à medida que este encontra diferentes tecidos. Já a refração compreende uma alteração na direção do raio transmitido, após o mesmo atravessar o estrato. Importa relatar que ambos decorrem da variabilidade do índice de refração nas diferentes camadas (Colls, 1984; Tipler, 2000; Baxter, 2003).

A transmissão caracteriza a passagem do feixe luminoso por todo o estrato. A difusão corresponde à transmissão da energia para as estruturas do mesmo tecido (Colls, 1984; Guirro e Guirro, 2002c). E o espalhamento, por sua vez, compreende qualquer mudança na direção da propagação do feixe luminoso, tendo em vista a óptica quântica (Baxter, 1995). Tipler (2000) e Baxter (1995), em complementação, diferenciaram os tipos de espalhamento levando em consideração o comprimento de onda do feixe incidente e as características do tecido receptor.

Considerando as interações da radiação luminosa com os tecidos, há relatos de uma amplificação da intensidade na epiderme e na derme, sendo esta muitas vezes superior àquela emitida pelo próprio dispositivo laser (Schindl *et al.*, 2000).

A distribuição gaussiana permite o cálculo da atenuação da radiação laser nos tecidos, a qual apresenta caráter exponencial. A profundidade em que o feixe encontra-se a 36% da radiação incidente é denominada profundidade de penetração. A partir disso, quando a intensidade de penetração alcança o dobro e o triplo da distância, o feixe luminoso encontra-se em 13% e 4,5% da radiação incidente, respectivamente (Baxter, 1995).

A profundidade de penetração da radiação luminosa depende especialmente do espalhamento e da absorção da mesma, logo, do comprimento de onda, da potência de saída, das características de pulso, do tipo de tecido irradiado e da técnica utilizada (Baxter, 1995; Túner e Hode, 2004). Comprimentos de onda entre 475 e 545 nm, entre 600 e 650 nm e entre 650 e 1000 nm apresentam profundidade de penetração de 0,3 a 0,5 mm, de 1 a 2 mm e de 2 a 3 mm, respectivamente (Baxter, 1995). Baxter (1995) relatou uma variação máxima de 20 a 30% destes valores de indivíduo para indivíduo, tendo em vista as diferenças nas propriedades ópticas tissulares entre os mesmos. Túner e Hode (2004) referiram que o Laser de He-Ne, com potência de saída de 3,5 mW, penetra até 8 mm, dependendo do tipo de tecido estimulado. Além disso, os autores consideraram a compressão tissular um fator importante no incremento da profundidade de penetração do feixe

luminoso. Esse fato é justificado pela redução do fluxo sanguíneo no local possibilitando maior ação da energia fotônica sobre os tecidos mais profundos (Stolik *et al.*, 2000; Túner e Hode, 2004).

Stolik *et al.* (2000) observaram diferentes profundidades de penetração do Laser de 632,8 nm e 675 nm frente a diferentes tecidos, a saber: 0,19 mm e 0,28 mm, respectivamente, para o sangue, 0,81 mm e 1,09 mm, respectivamente, para os pulmões, 1,81 mm e 2,03 mm, respectivamente, para a gordura mamária, dentre outros. Também foi evidenciada uma maior tendência à penetração da luz em alguns tumores em relação ao tecido sadio.

Neste mesmo aspecto, o coeficiente de anisotropia, que compreende o grau relativo de espalhamento isotrópico, ou seja, espalhamento em diferentes direções, auxilia na determinação da profundidade de penetração de tal radiação (Baxter, 1995).

Interessa enfatizar que, segundo Túner e Hode (2004), altas profundidades de penetração da radiação Laser não são necessárias para que haja bioestimulação em tecidos mais profundos.

Karu (1999), Baxter (2003) e Nussbaum *et al.* (2003) relataram que a absorção é realizada por moléculas fotoceptoras ou fotorreceptoras, capazes de serem excitadas pelo fóton incidente, em decorrência de suas configurações eletrônicas ou atômicas. Guirro e Guirro (2002c) complementaram que as mesmas podem ser primárias, as quais correspondem às substâncias fotorreativas, ou secundárias, que compreendem as estruturas responsivas ao campo eletromagnético. Nussbaum *et al.* (2003) mencionaram que tais biomoléculas estão localizadas no citoplasma celular, tanto ao nível celular quanto subcelular.

As moléculas orgânicas fotoceptoras são classificadas em dois grupos, o primeiro constituído por aminoácidos e ácidos nucleicos e o segundo caracterizado pelos cromóforos. Os aminoácidos apresentam absorção significativa na faixa intermediária do espectro ultravioleta. No espectro visível e infravermelho médio, essas moléculas ainda podem ser excitadas por campos de radiação externa, estimulando átomos para níveis energéticos mais altos e induzindo estágios rotacionais. Os ácidos nucleicos demonstram absorção significativa na porção média

do espectro ultravioleta e pequena absorção em regiões do espectro visível e próximo ao ultravioleta (Baxter, 1995).

Os cromóforos, por sua vez, são definidos como as estruturas moleculares capazes de absorver a luz no espectro visível e, via de regra, são constituintes das proteínas. Os mais comuns são aqueles derivados das porfirinas, tais como a hemoglobina e a melanina (Baxter, 1995; Nussbaum *et al.*, 2003). Baxter (1995) afirmou que as características de absorção da radiação são diferenciadas para a hemoglobina ligada ao O₂ e a hemoglobina reduzida. Karu (1999) considerou alguns componentes da cadeia respiratória, sobretudo a citocromo c-oxidase, como fotoceptores primários tanto para a radiação no espectro visível quanto próximo ao infravermelho.

As moléculas de água são as substâncias responsáveis pela absorção da radiação na faixa do infravermelho e do ultravioleta (Baxter, 1995; Nussbaum *et al.*, 2003).

A absorção da radiação é dependente do Laser utilizado, haja vista que os fotoceptores podem absorver a radiação em determinados comprimentos de onda, com variação entre 40 e 60 nm, correspondendo a cada transição de elétrons possível da molécula específica (Karu, 1999; Guirro e Guirro, 2002c; Nussbaum *et al.*, 2003).

No entanto, quando a energia incidente é inferior ao nível de excitação eletrônica, ou quando o acesso à energia é disponível após a transição entre os estados de excitação, a energia quântica é convertida em modos vibracionais, com efeitos mediados pela ativação da energia térmica (Nussbaum *et al.*, 2003) (figura 8). Tipler (2000) denominou essa interação de espalhamento elástico. O espalhamento inelástico, definido pelo mesmo autor, corresponde à absorção parcial do fóton incidente, na presença de maior energia por parte do mesmo em relação à diferença entre os níveis energéticos do cromóforo. Neste caso, a energia do fóton espalhada é inferior a do incidente.

Baxter (1995), em complementaridade, considerou a interação entre a radiação Laser e os tecidos em três níveis, a saber: atômico, molecular e macromolecular. O primeiro é predominante nos Raios X e Raios Gama. O nível molecular compreende a excitação de cadeias de elétrons, a qual pode resultar em

ruptura de algumas moléculas relativamente grandes ou mudanças nas cadeias de carbono, a excitação de átomos para níveis mais altos de oscilação, e a rotação de toda biomolécula ou de parte desta. E o nível macromolecular, para finalizar, resulta no espalhamento da luz após a interação molecular.

Tendo em vista essas especificidades na absorção é possível inferir que o mesmo feixe luminoso será absorvido por diversas biomoléculas, em diferentes graus, mesmo que a freqüência da radiação não corresponda à energia equivalente à diferença entre os níveis energéticos das mesmas.

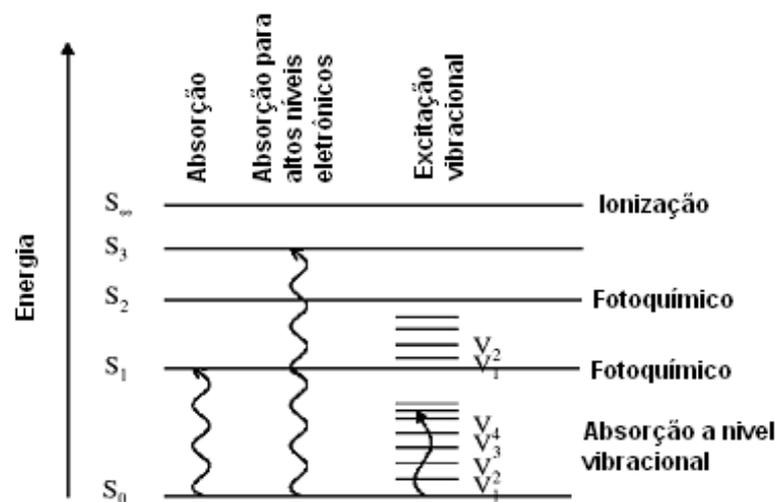


Figura 8. Interação entre a radiação e o tecido biológico, em termos de absorção, tendo em vista a energia incidente e a energia referente à diferença entre os níveis energéticos da molécula. S_0 representa o estado fundamental. Figura adaptada de Nussbaum *et al.* (2003).

A cadeia respiratória é a última etapa do processo catabólico dos alimentos, o qual se caracteriza também pela glicólise, β oxidação ou desaminação como etapa primária e pelo ciclo do ácido cítrico como etapa intermediária. O ciclo do ácido cítrico, também conhecido como ciclo de Krebs, gera elétrons de alta energia que são transferidos através da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$) para a cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna. Essa última etapa compreende o mecanismo pelo qual a energia é obtida através da passagem seqüencial de elétrons pelos complexos enzimáticos respiratórios, sendo traduzida em energia química (Olson, 1998; Wilden e Karthein, 1998; Alberts *et al.*, 2004). O transporte de elétrons segue uma seqüência específica de complexos enzimáticos, a saber: I ou complexo da

NADH desidrogenase, III ou complexo do citocromo b-c1 e IV também conhecido como complexo da citocromo oxidase, sendo este último o responsável pela redução do oxigênio em água. Vale ressaltar que a ubiquinona e o citocromo c são os responsáveis por mediar a transferência de elétrons entre os complexos enzimáticos. Essa migração de elétrons, energeticamente favorável, promove o bombeamento de H⁺ para o espaço intermembranoso mitocondrial, o que gera um gradiente eletroquímico de prótons, sendo este responsável pelo direcionamento da síntese de ATP na fosforilação oxidativa por intermédio da enzima ATP sintetase (Alberts *et al.*, 2004) (figura 9).

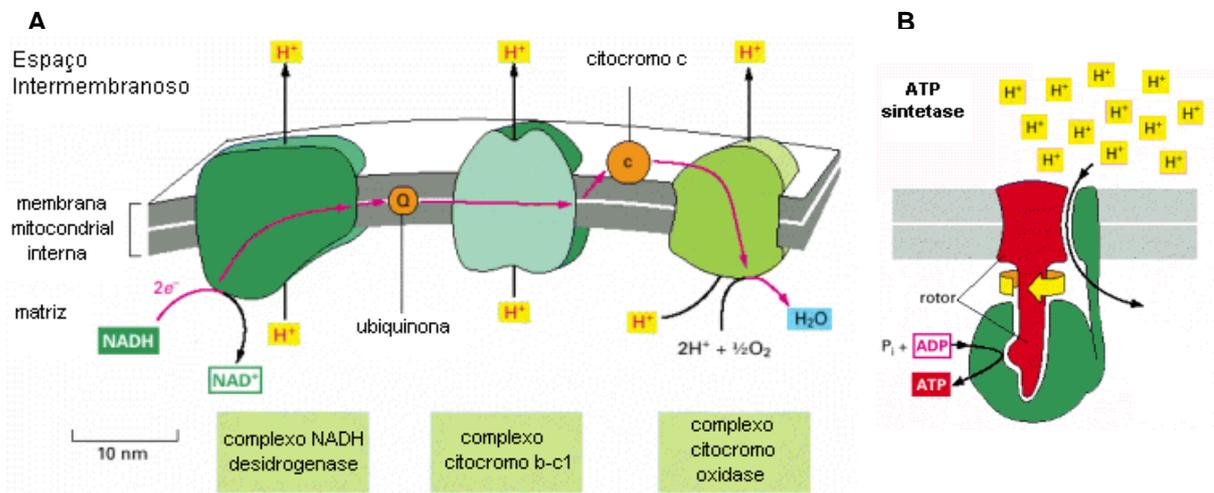


Figura 9. (A) Trajeto dos elétrons pela seqüência específica de complexos enzimáticos respiratórios. Durante a transferência dos elétrons do NADH para o oxigênio (linha vermelha) a ubiquinona e o citocromo c são responsáveis por mediar a transferência entre os complexos. Há um bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso mitocondrial, em cada complexo, com a passagem dos elétrons. (B) ATP sintetase e a produção de ATP pela passagem de prótons no seu interior direcionados ao meio intracelular. Figura adaptada de Alberts *et al.*(2004) .

Segundo Karu (1999) e Low e Reed (2001), os efeitos da irradiação do Laser vermelho estão relacionados à citocromo c-oxidase. Para Olson (1998) e Karu (1999) esta molécula corresponde a uma enzima terminal da cadeia respiratória das células eucarióticas, responsável pela transferência de elétrons do citocromo c para a molécula de oxigênio. A mesma apresenta em sua estrutura alguns componentes, os quais Karu (1999) designou como centros de reação por foto-excitação, mais especificamente: dois radicais heme (heme a e heme a₃), dois sítios de cobre (Cu_A e Cu_B), um sítio de zinco e um de magnésio. Destarte, os elétrons são transferidos do

citocromo c para o sítio Cu_A e, sequencialmente, para o radical heme *a* e para o centro binuclear heme $a_3\text{-Cu}_B$, onde o oxigênio é reduzido em água. A mesma autora ressaltou que apenas em sua forma intermediária, a citocromo c-oxidase é considerada fotoceptora primária, em relação às suas formas totalmente reduzida ou totalmente oxidada (figura 10).

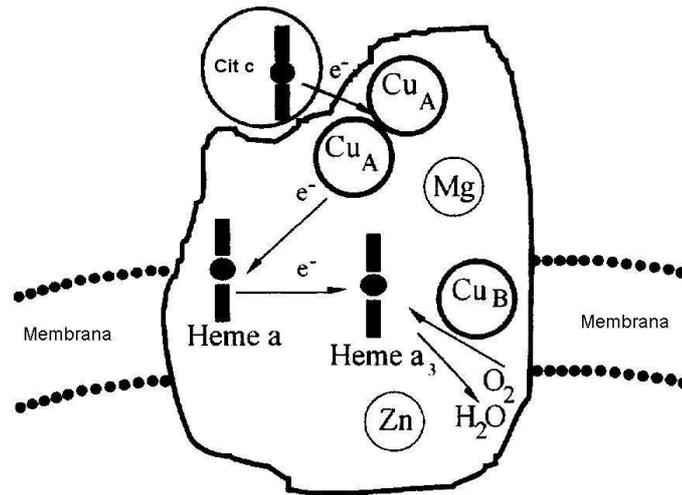


Figura 10. Esquema estrutural da citocromo c-oxidase. As setas indicam o trajeto seguido pelos elétrons, do citocromo c para o sítio Cu_A e, sequencialmente, para o radical heme *a* e para o centro binuclear heme $a_3\text{-Cu}_B$, onde o oxigênio é reduzido em água. Figura adaptada de Karu (1999).

Além disso, diferentes comprimentos de onda podem influenciar a transferência de elétrons em tal enzima através de diferentes formas, assim como estimular fotorreceptores relativos a diferentes moléculas da mesma cadeia respiratória. Neste aspecto, Karu *et al.* (2005b) observaram que comprimentos de onda entre 710 e 790 nm são absorvidos pelo fotoceptor relativamente reduzido, enquanto comprimentos de onda na faixa de 650 a 680 nm são absorvidos pelo cromóforo em estado de relativa oxidação. Deste modo, diferentes respostas fotobiológicas são obtidas. Vale citar a flavoproteína nicotinamida dinucleotídeo desidrogenase como outra molécula fotoceptora da cadeia respiratória (Karu, 1999).

Neste aspecto, a interação do tecido biológico com a radiação Laser gera processos fotobiológicos, que compreendem alterações bioelétricas, bioquímicas e bioenergéticas. Tais respostas podem ser primárias ou secundárias. As primárias

são definidas como as respostas celulares decorrentes da absorção da energia, e as secundárias, as alterações fisiológicas que não só afetam a unidade celular, mas todo o tecido (Guirro e Guirro, 2002c). Karu (1987; 1999), em complemento, classificou as secundárias como àquelas respostas que ocorrem horas e até mesmo dias após a irradiação.

2.2.7 Efeitos do Laser de Baixa Intensidade: Aspectos Moleculares e Celulares

Segundo Karu (1999), a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso, resposta primária, envolve quatro processos (figura 9). O primeiro corresponde à aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória através de uma mudança nas propriedades de oxiredução dos transportadores. O segundo processo refere-se ao incremento na temperatura local dos cromóforos, em decorrência da fração de energia de excitação que inevitavelmente é convertida em calor. Tal incremento pode causar alterações estruturais nos fotorreceptores e, deste modo, desencadear alterações bioquímicas (Letokhov, 1991).

O terceiro evento concerne a certas moléculas fotoceptoras, como as porfirinas e flavoproteínas, que podem ser reversivelmente convertidas em estruturas fotosensibilizadas, com a geração de oxigênio molecular (O_2), o qual pode exercer papel mediador nos efeitos biológicos da irradiação. E o quarto processo, por fim, é representado pela liberação de radicais livres, como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), frente à redução do oxigênio em água no final da cadeia respiratória. Embora a mitocôndria apresente um mecanismo de reabsorção de tais radicais, essas substâncias podem desencadear respostas secundárias múltiplas, uma vez que são fonte de elétrons para a fosforilação do ADP (Olszewer, 1995; Karu, 1999). Karu (1999) salientou que provavelmente mais de um desses fatores são responsáveis simultaneamente pelos efeitos desencadeados pela irradiação luminosa de baixa potência.

Karu *et al.* (2005a) e Vladimirov *et al.* (2004) relataram que o NO reduz a atividade da cadeia respiratória através da ligação do mesmo nos carreadores de elétrons, como os citocromos e a citocromo oxidase, reduzindo ou inativando suas funções. Neste aspecto, Vladimirov *et al.* (2004), paralelamente a Karu (1999),

propuseram que a radiação luminosa promove a fotólise do complexo NO/componentes da cadeia respiratória, liberando o NO e promovendo a restauração e otimização da respiração celular e, conseqüentemente, da síntese de ATP. Além disso, os autores consideraram a reativação da Cu-Zn-superóxido dismutase, inativa em baixo pH, e a ação fotodinâmica de sensibilizadores endógenos responsáveis por iniciar os efeitos benéficos mediados pela radiação luminosa de baixa potência.

As primeiras mudanças, induzidas pela luz, nas moléculas fotorreceptoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas celulares, as quais não necessitam de maior estimulação luminosa e compreendem a base dos efeitos secundários. Esta cascata engloba outras mudanças redox, transdução do foto-sinal e amplificação da cadeia, ou seja, transferência de energia para outras moléculas por intermédio de interações químicas, com conseqüente modulação das reações bioquímicas e macro-efeitos biológicos (figura 11) (Karu, 1999; Nussbaum *et al.*, 2003).

Deste modo, a ativação da cadeia transportadora de elétrons resulta em incrementos no potencial elétrico da membrana mitocondrial, aumento de ATP e redução do pH citoplasmático, sendo o último em decorrência do aumento de íons H^+ intracelulares, os quais controlam o sistema de antiporte Na^+/H^+ responsável pela alcalinização do meio interno da célula. Essa alteração no pH corresponde a um dos mecanismos envolvidos na transmissão de sinais mitogênicos à célula. O aumento de ATP e de íons H^+ , também promovem a ativação da enzima $Na^+ K^+ ATPase$, a qual proporciona aumento de íons K^+ e redução de íons Na^+ , mecanismo que igualmente ao anterior exerce papel na proliferação celular. Além disso, as alterações na cadeia respiratória promovem mudanças no fluxo de cálcio entre a mitocôndria e o citoplasma assim como alterações nas concentrações de AMPc (Karu, 1988).

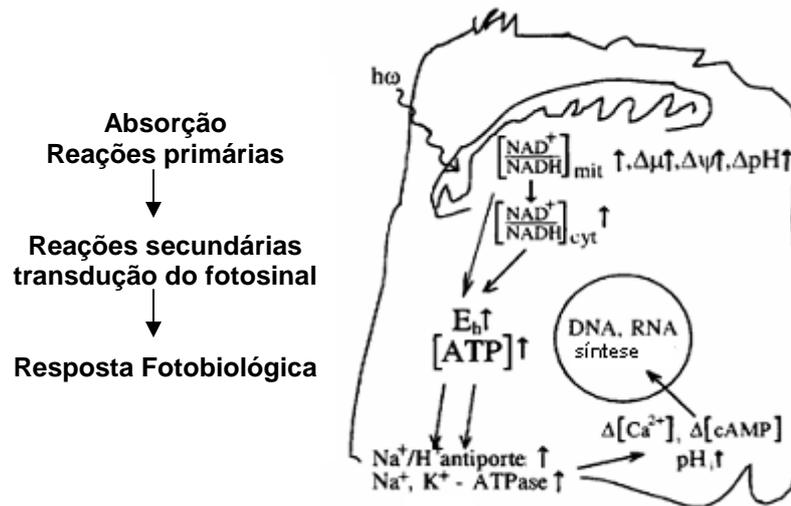


Figura 11. Esquema das reações primárias e secundárias, frente ao laser de baixa intensidade, resultando em proliferação de células mamárias. A absorção da radiação luminosa promove a ativação da cadeia respiratória e a oxidação do NADH, desencadeando modificações no estado redox da mitocôndria e do citoplasma, incrementos na força próton-motiva, no potencial elétrico da membrana mitocondrial, na produção de ATP, bem como promovendo o influxo de cálcio e a acidificação do citoplasma. Essa redução do pH controla o transporte ativo da célula, ocasionando o aumento do pH, o qual está envolvido na transmissão de sinais mitogênicos celulares. mit – mitocôndria. cyt – citoplasma. $\Delta\mu$ – força próton-motiva. $\Delta\psi$ – potencial elétrico da membrana mitocondrial. E_h – concentração de H^+ . Figura adaptada de Karu (1999).

Vale enfatizar as relações entre o metabolismo do tecido adiposo, especificamente as variações nas concentrações de AMPc, com os efeitos celulares exercidos pelo laser de baixa intensidade.

No que tange ao aspecto bioelétrico, o efeito desta natureza refere-se às respostas decorrentes da alteração do potencial elétrico. Vale citar o efeito principal de normalização do potencial de membrana e o consequente equilíbrio da atividade funcional celular (Guiro e Guiro, 2002c). O efeito bioenergético, por sua vez, compreende as respostas primárias já discutidas anteriormente.

Em termos bioquímicos, os efeitos da energia luminosa apresentam-se de duas maneiras, a saber: estimulando a liberação de substâncias pré-formadas, como a histamina, serotonina, bradicinina, ou modificando as reações enzimáticas normais, seja no sentido de excitação, seja no sentido de inibição das mesmas (Guiro e Guiro, 2002c).

Tendo em vista os efeitos do Laser de baixa de baixa intensidade, no que tange à modulação dos processos biológicos, a Lei de Arndt-Schultz é proposta como modelo ao prover base teórica para a dosimetria. Em termos gerais, ela

caracteriza a biomodulação frente à densidade de energia empregada. Mais especificamente, a bioestimulação em densidades mais baixas e a bioinibição frente a densidades mais altas. Neste processo, há três limiares, sendo dois para o início da estimulação e da inibição, respectivamente, e um para inibições maiores, ou seja, para além do estado basal (figura 12) (Baxter, 2003; Túner e Hode, 2004).

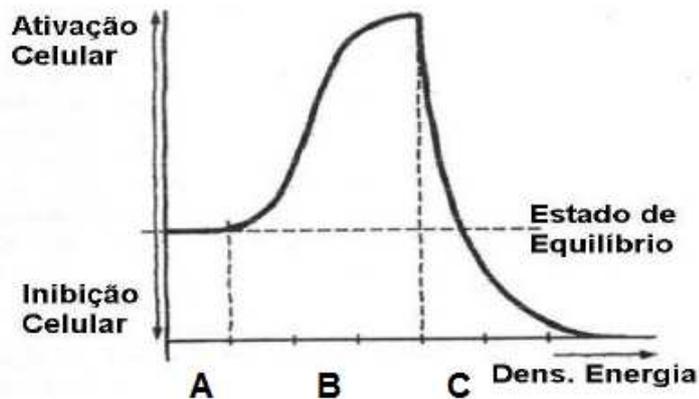


Figura 12. Lei de Arndt-Schultz. Biomodulação da atividade biológica frente a incrementos na densidade energética. A) Pré-limiar. Ausência de ativação do metabolismo (estado de repouso). B) bioestimulação, ativação dos processos biológicos. C) Bioinibição. Figura adaptada de Baxter (1994).

Alguns estudos sugeriram que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre $0,5$ e 10 J/cm^2 (O'kane e Shields, 1994; Yu e Naim, 1997; Schindl *et al.*, 2003). Já Túner e Hode (2004) consideraram a dose ótima para bioestimulação entre $0,5$ e 4 J/cm^2 .

Karu (1987) considerou que o incremento da densidade de energia, para além de um determinado limiar, promove dano ao fotoceptor com conseqüente redução do metabolismo. Já incrementos maiores proporcionam destruição dos fotorreceptores e letalidade celular. Além disso, tal biomodulação pode ser decorrente das relações entre densidade de energia empregada e mudanças redox, além de outros fatores, uma vez que segundo Karu (1999), mudanças em direção à oxidação são associadas à estimulação da vitalidade celular e, em contrapartida, alterações em direção à redução estão relacionadas à inibição dos processos biológicos.

A autora ainda relatou que células com pH inferior ao normal se apresentam mais sensíveis à ação do Laser, quando comparadas às células com pH normal, na presença de modificações no estado redox em direção à redução. Vladimirov *et al.* (2004) relataram que meios com baixo pH reduzem a atividade da superóxido dismutase. Como o Laser reativa tal enzima, os efeitos benéficos proporcionados pela mesma provavelmente se somam aos demais, o que pode justificar os efeitos mais pronunciados observados em tal condição. Karu (1987), em complementação, afirmou que o estado fisiológico da célula previamente à irradiação, como condições nutricionais, bem como fatores ambientais afetam a magnitude da resposta celular e tissular frente a tal terapia. Essas evidências, em associação a outras variáveis, justificam a variação da magnitude dos efeitos observados frente à aplicação do Laser de baixa potência.

Klebanov *et al.* (2005) avaliaram a formação de NO, peroxinitrito e radicais superóxido 24 horas após a ação do laser de He-Ne com 632,8 nm de comprimento de onda. Os autores observaram um incremento tanto do NO nítrico quanto da atividade da superóxido-dismutase em doses inferiores a 0,94 J/cm². Em contrapartida, a produção de peroxinitrito se elevou em doses superiores a esta. Neste mesmo aspecto, Drugova *et al.* (2001) obtiveram a reativação de enzimas antioxidantes nos cardiomiócitos, em especial, a superóxido dismutase, após a irradiação dos mesmos, tanto com Laser vermelho quanto com luz não coerente durante a reperfusão miocárdica pós-isquêmica. Já em altas doses, os autores observaram contrações arrítmicas e fibrilação no músculo cardíaco.

A superóxido-dismutase, além de exercer ação anti-oxidante, por interceptação de radicais livres, promove o incremento da atividade fagocítica, bem como o relaxamento da parede vascular por prolongar a atividade do NO, dentre outros. Por outro lado, o peroxinitrito é extremamente citotóxico, podendo induzir ou agravar estados patológicos (Olszewer, 1995; Klebanov e Poltranov, 2005).

Guysoy *et al.* (2006) observaram bioestimulação ótima em células sanguíneas mononucleares frente à irradiação por intermédio do Laser He-Ne com 2,5 J/cm² de densidade energética.

Importa enfatizar a importância da adequada determinação da densidade de energia durante a laserterapia de baixa intensidade, tendo em vista o aspecto biofotomodulação.

Tong *et al.* (2000) avaliaram a relação entre alguns efeitos biológicos e o comprimento de onda da laserterapia de baixa intensidade. Os autores observaram um incremento de cálcio e da atividade imunológica, sendo o último na presença de imunossupressão frente à laserterapia de baixa intensidade com 532, 632,8 e 650 nm de comprimento de onda. Por outro lado, nenhum efeito foi obtido após a irradiação com 810 nm e 1300 nm para o cálcio, e após 1520 nm para a atividade imunológica. Em termos comparativos, Koutná *et al.* (2003) afirmaram que outros parâmetros podem se apresentar mais importantes, na determinação dos resultados, em relação ao comprimento de onda.

Koutná *et al.* (2003) relataram que o modo pulsado é mais efetivo em relação ao modo contínuo. Os autores obtiveram uma maior proliferação de células HeLa submetidas à irradiação por Laser (semicondutor com 830 nm) pulsado (5 KHz) em relação ao modo contínuo, frente à variação da densidade de energia entre 2 e 99 J/cm². Esse incremento foi significativo apenas 72 a 92 h após a irradiação proposta em relação a 24 e 48 h. Já Webb e Dyson (2003) obtiveram uma redução de fibroblastos após a irradiação com Laser de Ga-Al-As, 880 nm, pulsado (5 KHz) com densidade de energia entre 2,4 e 4 J/cm². Os autores justificaram tal resultado pela possível inibição de fatores de crescimento por um lado, e pela provável indução de modificações oxidativas com a conseqüente redução da função celular por outro, tendo em vista suas inter-relações.

2.2.8 Macroeifeitos Biológicos e Aplicações na Área da Saúde

Os efeitos macroscópicos, decorrentes da irradiação luminosa de baixa intensidade, ocorrem em conseqüência dos efeitos moleculares e celulares.

Uma das aplicações mais fortemente estudadas de tal modalidade terapêutica consiste na reparação tecidual. Diversos estudos obtiveram efeitos positivos apreciáveis, após a aplicação do Laser de baixa intensidade, neste processo (Haas *et al.*, 1990; Ghamsari *et al.*, 1997; Tatarunas *et al.*, 1998; Simunovic *et al.*, 2000; Hopkins *et al.*, 2004; Marcon e Sanfelice, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Júnior *et al.*, 2006). De modo geral, foram observados: incremento na motilidade de queratinócitos (Haas *et al.*, 1990), maior proliferação de células endoteliais (Schindl

et al., 2003) e aumento da vascularização (Júnior *et al.*, 2006), maior proliferação fibroblástica (Vinck *et al.*, 2003; Júnior *et al.*, 2006), incremento no número de fibras colágenas (Ghamsari *et al.*, 1997; Simunovic *et al.*, 2000; Pugliese *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006) e elásticas (Pugliese *et al.*, 2003), bem como maior organização do tecido de granulação (Ghamsari *et al.*, 1997; Tatarunas *et al.*, 1998; Simunovic *et al.*, 2000; Júnior *et al.*, 2006).

Pinfildi *et al.* (2005) evidenciaram uma maior viabilidade de retalhos cutâneos de ratos submetidos ao Laser de He-Ne em relação ao grupo controle. Os autores observaram 48,8% de necrose local neste grupo e 38,6%, 35,3% e 22,6%, em média, nos grupos submetidos à irradiação do tecido, tendo em vista diferentes técnicas de aplicação.

Além disso, DeSimone *et al.* (1999) contemplaram efeito bactericida do Laser de baixa intensidade em microorganismos fotosensibilizados *in vitro*.

No que concerne ao processo de reparação em diferentes tecidos, efeitos positivos são demonstrados para o tecido ósseo (Freitas *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003), tecido nervoso (Khullar *et al.*, 1999; Oron *et al.*, 2006), tecido muscular esquelético (Shefer *et al.*, 2002), cardíaco (Drugova e Monich, 2001) e tecido cartilaginoso em condições específicas (Yueh-Shuang *et al.*, 2004). Túner e Hode (2004) relataram a melhora da qualidade de vida, por alívio dos sintomas, de pacientes portadores de moléstias reumáticas frente à laserterapia de baixa intensidade.

Hsin-Su *et al.* (2003) observaram graus de repigmentação cutânea, de pacientes portadores de vitiligo, após a irradiação luminosa por Laser de baixa intensidade.

Túner e Hode (2004) salientaram os efeitos regenerativos e estimuladores funcionais da laserterapia de baixa intensidade nos vasos linfáticos e venosos. Neste sentido, efeitos pronunciados relacionados à redução de edemas são relatados (Ghamsari *et al.*, 1997; Túner e Hode, 2004; Kaviani *et al.*, 2006). Tendo em vista este aspecto, diversos estudos evidenciaram efeitos antiinflamatórios mediados por tal modalidade terapêutica (Ghamsari *et al.*, 1997; Qadri *et al.*, 2005; Bjordal *et al.*, 2006). Bjordal *et al.* (2006) observaram aumento do fluxo sanguíneo e redução das concentrações de Prostaglandina E₂, após a laserterapia

biomodulatória, em indivíduos portadores de tendinite de Aquiles. Esse aumento do fluxo sanguíneo foi observado por outros autores (Schindl *et al.*, 1998; Mohammed-Ihsan, 2005) e segundo Colls (1984) decorre da abertura do esfíncter pré-capilar, dentre outros fatores, mediados pelo Laser de baixa intensidade. Em termos complementares, há relatos de maior atividade por parte das células de defesa (Tong e Liu, 2000).

O estudo de Sandoval-Ortiz *et al.* (2003) demonstrou o efeito da radiação luminosa sobre as proteínas plasmáticas de coelhos, portadores de inflamação articular induzida, sinalizando o efeito sistêmico de tal terapia.

Lopes *et al.* (2006) obtiveram menor incidência de xerostomia bem como redução da gravidade da mucosite oral, em pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço durante o tratamento por radioterapia, submetidos ao Laser de baixa intensidade.

Existem relatos de efeitos benéficos de tal técnica terapêutica no controle de cicatriz hipertrófica e quelóide (Colls, 1984; Webb e Dyson, 2003). Neste aspecto, Webb e Dyson (2003) obtiveram uma redução de fibroblastos após a irradiação com Laser de Ga-Al-As, 880 nm, pulsado (5 kHz) com densidade de energia entre 2,4 e 4 J/cm².

A analgesia compreende outro efeito importante observado frente à laserterapia biomodulatória (Colls, 1984; Ribeiro e Pacheco, 2003; Kaviani *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2006). De modo sucinto, esse efeito provém da redução do processo inflamatório, incremento microcirculatório, aumento do limiar doloroso, estímulo das fibras nervosas grossas e estímulo da produção de opióides endógenos, entre outros fatores (Colls, 1984; Túner e Hode, 2004). Túner e Hode (2004) relataram que em processos algícos mais leves, o alívio completo da dor pode ser obtido com intensidades entre 3 e 4 J. Contudo, na presença de dor aguda de intensidade moderada a alta, densidade energéticas altas são necessárias para o alívio imediato.

Acerca da capacidade aeróbica, uma maior adaptabilidade ao exercício desta natureza, por inibição da lactato desidrogenase, foi evidenciada em animais submetidos ao treinamento aeróbico associado à fotoestimulação por intermédio do

Laser de baixa intensidade, sugerindo otimização da via oxidativa (Vieira *et al.*, 2006).

À despeito do tecido adiposo, há relatos na literatura que evidenciaram indução lipolítica (Neira *et al.*, 2002) e alterações nos adipócitos multiloculares, a saber: aumento e fusão dos vacúolos de gordura (Medrado *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da PUCPR (CEUA-PUCPR) sob o registro n.º159/06 (Apêndice 1). Todos os procedimentos bem como os cuidados básicos com a amostra selecionada foram realizados de modo a respeitar a lei nº 6.638 de 1979, e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea, 1991). Cabe mencionar que a terminologia utilizada está fundamentada na Nômina Anatômica Veterinária vigente (I.C.V.G.A.N, 2005).

3.1 DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA – ESTUDOS PRELIMINARES

Com o propósito de determinar o local de maior concentração de tecido adiposo subcutâneo no *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, foi realizado, inicialmente, o estudo A, o qual consistiu na dissecação de dois desses animais. O local selecionado para o experimento compreendeu a região torácica dorsal. Contudo, tendo em vista o baixo acúmulo de gordura subcutânea nesses roedores, juntamente com a necessidade de quantidades consideráveis desse tecido; para os objetivos colimados, optou-se por induzir obesidade nos mesmos.

Neste sentido, foi realizado o estudo B, o qual compreendeu a indução da obesidade no animal proposto, por diferentes métodos, com o objetivo de identificar o modelo mais efetivo: (1) método químico, aplicação do glutamato monossódico (MSG) no período neonatal; (2) método alimentar, dieta hipercalórica pelo incremento lipídico e; (3) método químico conjuntamente com o alimentar. Entretanto, grandes dificuldades foram encontradas, sendo os resultados obtidos inferiores às expectativas mínimas. Dentre as intempéries destacaram-se a dificuldade intrínseca destes animais em aumentar o tecido adiposo subcutâneo, a resistência dos mesmos na assimilação de tipos diferenciados de ração, bem como

o óbito excessivo e as discrepâncias entre os animais submetidos às injeções subcutâneas de MSG no período neonatal.

Assim sendo, uma posterior complementação do estudo A foi realizada, de modo a definir, dentre diferentes faixas etárias, àquela que apresentava maior concentração de tela subcutânea no local determinado. Para a complementação do estudo piloto A, 8 *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, com diferentes faixas etárias, foram dissecados, após eutanásia por dose letal de cloridrato de Ketamina (Vetanarcol[®]) associado à Xilazina (Rompun[®]), via intramuscular. Observou-se que ratos, adultos a idosos, com 6 meses de vida, fêmeas, apresentavam maiores concentrações de adiposidade subcutânea na região torácica dorsal, sendo suficiente para as análises pretendidas sem a necessidade de aumentá-la.

Por fim, foi realizado o estudo histomorfométrico preliminar (estudo C), piloto do estudo final, o qual teve por intento a seleção das fluências a serem aplicadas, a seleção das variáveis a serem avaliadas, bem como do método para tal avaliação, e o desvio padrão para a estimativa do tamanho amostral. A amostra foi composta por 20 *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, adultos, fêmeas, randomizados em quatro grupos, com 5 animais cada, a saber: L1, L2, L3 e L4. Os três primeiros grupos foram submetidos à laserterapia de baixa intensidade, por intermédio do Laser de In-Ga-Al-P Endophoton[®], da KLD Biosistemas, e o grupo L4 correspondeu ao grupo controle. A anestesia foi realizada com Xilazina (Rompun[®]) a 10 mg/kg e cloridrato de Ketamina (Vetanarcol[®]) a 90 mg/kg, via intramuscular, previamente a cada procedimento proposto. Os animais foram submetidos à tricotomia da região torácica dorsal, aproximadamente 3 cm², e à irradiação, durante o tempo pré-determinado pelo equipamento, levando-se em consideração as densidades de energia selecionadas, uma vez que a potência do aparelho é fixa, em: 3, 14 e 28 s para os grupos L1, L2 e L3, respectivamente. A aplicação do Laser foi realizada em uma área de 2 cm² na região citada, através da técnica pontual, em quatro pontos.

A energia empregada, por ponto, foi 0,06J (2 J/cm²) para o grupo L1, 0,31J (8J/cm²) para o grupo L2 e 0,62J (16 J/cm²) para o grupo L3. Convém relatar que as energias foram selecionadas levando-se em consideração o aspecto biofotomodulação e os resultados dos trabalhos envolvendo tal modalidade

terapêutica. Os grupos propostos foram submetidos aos protocolos específicos três vezes por semana, por três semanas, totalizando nove aplicações.

Os animais foram sacrificados no nono dia de aplicação, e a eutanásia foi efetuada com a aplicação de dose letal de cloridrato de Ketamina (Vetanarcol[®]) associado à Xilazina (Rompun[®]). Previamente à eutanásia, o tecido estimulado foi excisado e submetido ao tratamento histológico de rotina pela técnica HE. Os índices histomorfométricos avaliados foram o número e a área dos adipócitos uniloculares. O número de células foi avaliado, junto ao software Image-Pro Plus, em 5 sub-campos de 49.146 μm por animal. Para a análise da área, foi utilizado um algoritmo em interface MATLAB 6.5 da MathWorks, desenvolvido especialmente para o presente experimento, o qual proporciona a área, dentre outras variáveis, das células selecionadas, em pixels. Interessa mencionar que 1 pixel equivale a 0,0631966 μm^2 .

No que tange ao tratamento estatístico, para as comparações entre as energias pontuais empregadas, a saber: 0,06J; 0,31J; 0,62J e 0J (controle), foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As comparações entre o grupo estudo e o grupo controle, na presença da união de diferentes grupos, foram realizadas por intermédio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O índice de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.2 ESTUDO FINAL

3.2.1 Modelo experimental e cuidados gerais

A amostra foi constituída por 42 *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, adultos, com seis meses de vida, fêmeas, procedentes do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR. Os animais permaneceram durante todo o período no Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, em caixas de polipropileno forradas com cepilho e cobertas com grade. Cada caixa abrigou 5 animais, independentemente do grupo ao qual pertencia, experimental ou controle, com a identificação localizada na cauda. A amostra permaneceu, ainda, em ambiente climatizado com temperatura em 22° C e

controle de período claro/escuro com 12 h de duração cada. Foi oferecido alimento sólido peletizado, ração Labina da Purina, e água *ad libitum*.

3.2.2 Grupos experimentais e procedimentos básicos

Os animais foram randomizados em dois grupos, com 21 animais cada, a saber: E e C. O primeiro grupo foi submetido à laserterapia de baixa intensidade e o grupo C correspondeu ao grupo controle. A anestesia foi realizada com Tiopental sódico (Thionembutal[®]), diluído em soro fisiológico a 0,9% na proporção de 1g para 40 ml, respectivamente, com dose de 1 ml por kg de peso, via intraperitoneal, previamente a cada procedimento proposto.

Inicialmente, a amostra foi submetida à tricotomia da região torácica dorsal (figura 13), aproximadamente 3 cm², local no qual foi realizada a aplicação do laser através da pele íntegra. Convém citar que a tricotomia foi realizada preliminarmente a cada irradiação local, objetivando minimizar os fatores atenuadores da absorção do feixe luminoso.

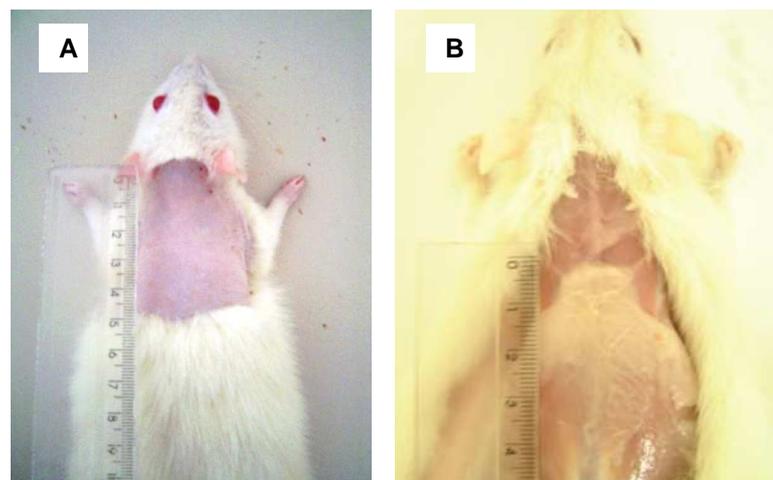


Figura 13. Local selecionado para a aplicação do laser. A) Tricotomia da região torácica dorsal. B) Dissecação do animal proposto pelo presente estudo (estudo piloto A). Maior adiposidade subcutânea localizada na região torácica dorsal. As figuras A e B retratam o *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, fêmea, com 6 meses de vida.

3.2.3 Equipamento empregado

A laserterapia foi aplicada por intermédio do Laser de In-Ga-Al-P Endophoton[®] modelo LLT 0107, caneta emissora P30P660-020 da KLD Biosistemas, com 660 nm de comprimento de onda, em modo contínuo (figuras 14A e 14B). Os demais parâmetros, segundo fabricante, são: 20 mW de potência e 0,035 cm² de área de emissão. O óculos de proteção específico para tal comprimento de onda, fornecido também pela KLD Biosistemas, foi utilizado durante todas as aplicações da radiação laser (figura 14C).

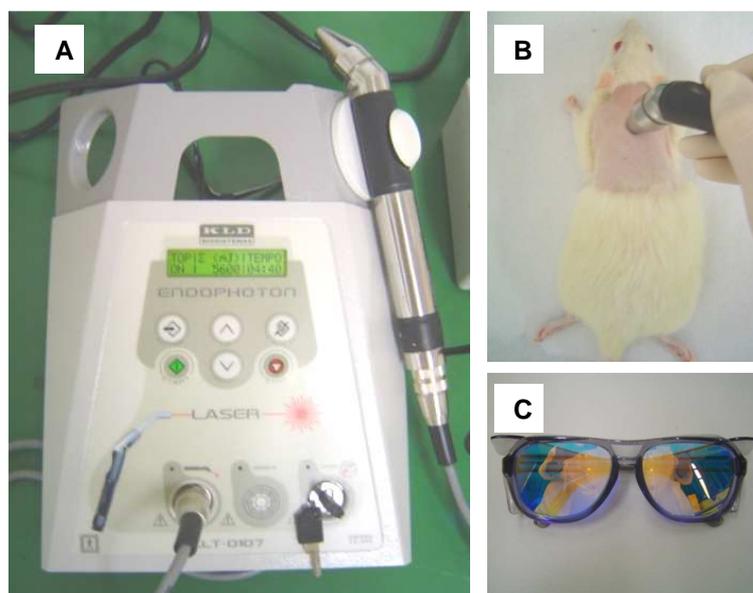


Figura 14. A) Laser Endophoton[®], modelo LLT 0107 e caneta emissora P30P660-020, da KLD Biosistemas. B) Posicionamento do probe do Laser na região torácica dorsal do animal proposto. C) Óculos de proteção específico.

3.2.4 Aferição do equipamento

A potência do equipamento foi aferida por meio do medidor de potência Pocket Power da Melles Griot (figura 15). A média de 5 aferições encontrou-se em 22,15 \pm 0,59 mW, evidenciando que a potência do equipamento encontra-se em conformidade com a potência referida pelo fabricante. Cabe citar que a potência aferida foi utilizada para a determinação da energia.



Figura 15. Medidor de potência Pocket Power da Melles Griot.

3.2.5 Procedimentos

O tecido foi irradiado durante o intervalo de tempo pré-determinado pelo equipamento, 3 s, levando-se em consideração a densidade de energia selecionada, uma vez que a potência do aparelho é fixa. A aplicação do Laser foi realizada por meio da técnica pontual, com discreta compressão tecidual, em uma área de 2 cm² na região citada. A região torácica dorsal foi dividida em quatro quadrantes, e a aplicação foi realizada no ponto central dos quadrantes, totalizando quatro pontos de aplicação.

A energia empregada, para o grupo E, foi de 0,06J por ponto, 0,26J por aplicação, sendo 2 J/cm² a densidade energética. Importa relatar que a energia foi selecionada levando-se em consideração o aspecto biofotomodulação, os resultados dos trabalhos envolvendo tal modalidade terapêutica, bem como os resultados do estudo histomorfométrico preliminar. Segundo os resultados de tal piloto, não existe diferença significativa entre as energias 0,06J; 0,31J e 0,62J por ponto, ou 0,26J; 1,24J e 2,48J por aplicação, em termos histomorfométricos, no tecido adiposo unilocular de ratos.

O grupo C, controle, foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo anterior, entretanto, o equipamento permaneceu desligado por todo o período. Os grupos propostos foram submetidos aos protocolos específicos três vezes por semana, totalizando doze aplicações.

Os animais foram sacrificados no décimo segundo dia de aplicação possibilitando uma análise específica do tecido adiposo. A eutanásia foi efetuada com a aplicação de dose letal de Tiopental sódico (Thionembutal[®]), via intraperitoneal.

3.2.6 Avaliação bioquímica

A quantificação do glicerol foi realizada em dois momentos: antes e após a última irradiação tissular. Com isso, objetivou-se a comparação dos resultados obtidos, frente a aplicação do laser, no mesmo animal e entre os diferentes grupos. A coleta do sangue foi realizada via intracardíaca (1 ml) (figura 16A), e as amostras foram submetidas à centrifugação, na Centrífuga 5415 D, da Eppendorf, a 12 rpm durante 16 min. Na seqüência, o plasma foi separado, com pipeta Eppendorf Reseach 200 associada a ponteiros descartáveis, e congelado para a avaliação do glicerol.

O glicerol plasmático foi avaliado por meio do kit enzimático específico para tal soluto, fornecido pela Laborclin produtos para laboratórios LTDA, e espectrofotometria, por intermédio do espectrofotômetro Genesys 10 μ V da Thermo Spectronic, com comprimento de onda de 500 nm (figura 16B).

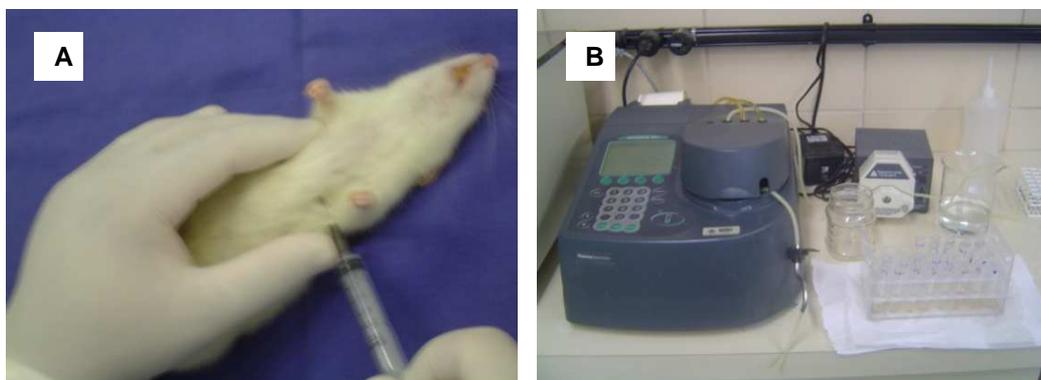


Figura 16. (A) Coleta de sangue no *Rattus Norvegicus Albinus*, via intra-cardíaca, objetivando a quantificação do glicerol plasmático. (B) Espectrofotômetro Genesys 10 μ V da Thermo Spectronic.

A concentração do glicerol foi determinada pela razão entre a absorbância do teste e a absorbância do padrão multiplicado por 200 (equação 4).

$$GI = At/Ap \times 200 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

GI = Glicerol em mg/dl

At = Absorbância do teste

Ap = Absorbância do padrão

3.2.7 Microscopia óptica e eletrônica

Previamente à eutanásia, o tecido estimulado foi excisado, de modo a proporcionar três amostras do mesmo. A primeira foi asseada em solução salina a 0,9%, fixada em formaldeído a 10%, e submetida ao tratamento histológico de rotina pela técnica HE. Os cortes foram efetuados no micrótomo Leica EG 1160 a 4 μm de espessura. A segunda amostra do tecido excisado foi criofixada em nitrogênio líquido por alguns minutos, mantida a -80°C por 30 dias, emblocada em gel específico para tecidos criofixados da Jung Laborgebrauch e, submetida ao tratamento histológico pela técnica Sudan III (Ross e Reith, 1993; Michalany, 1998). Os cortes foram realizados no criostato Leica CM 1850 a -34°C a 10 μm de espessura. Posteriormente às colorações, as lâminas foram cegadas e avaliadas no microscópio óptico Olympus BX50 associado ao tubo alongador Sony U-SPT e à câmera digital Sony CCD-Iris, acoplados ao computador, localizados no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR (figura 17).



Figura 17. Microscópio Óptico Olympus BX50 associado ao tubo alongador Sony U-SPT e à câmera digital Sony CCD-Iris, acoplados ao computador. Sistema pertencente ao Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

As imagens foram visualizadas com objetiva de 20X e analisadas pelo software Image-Pró Plus fabricado pela Media Cybernetics e comercializado pela Micronal (figura 18), bem como por um algoritmo desenvolvido especialmente para o presente experimento, implementado em interface MATLAB 6.5 da MathWorks.

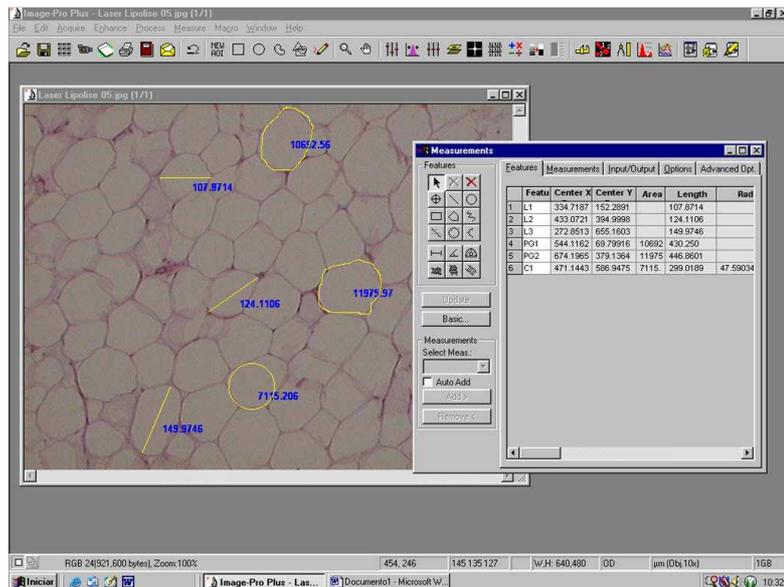


Figura 18. Interface de visualização do software Image-Pró Plus da Media Cybernetics, comercializado pela Micronal, utilizado para análises histológicas. Disponível no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. As indicações em amarelo representam algumas medidas morfométricas passíveis de serem realizadas junto ao software.

Os índices histomorfométricos avaliados compreenderam: o número e a área média das células adiposas uniloculares. O número de células foi avaliado, junto ao software Image-Pró Plus, em 5 sub-campos de 1.747 μm por campo, em 5 campos por animal. Para a análise da área, foi utilizado um algoritmo em interface MATLAB 6.5 da MathWorks, o qual proporcionou a área, em pixels, das células selecionadas manualmente para avaliação. Foram avaliadas 100 células por animal, mais especificamente: células íntegras ou com discretas alterações sem o comprometimento da forma e de suas delimitações, inteiramente localizadas no campo, ou seja, sem tocar a borda, e na ausência de vasos sanguíneos ou folículos pilosos adjacentes imediatos. Todas as células que se enquadravam nos critérios de inclusão foram selecionadas, em múltiplos campos, até atingir o número total proposto. A seleção deu-se no sentido horizontal da esquerda para a direita, tendo por base quatro linhas horizontais traçadas, automaticamente no campo pelo algoritmo (figura 19).

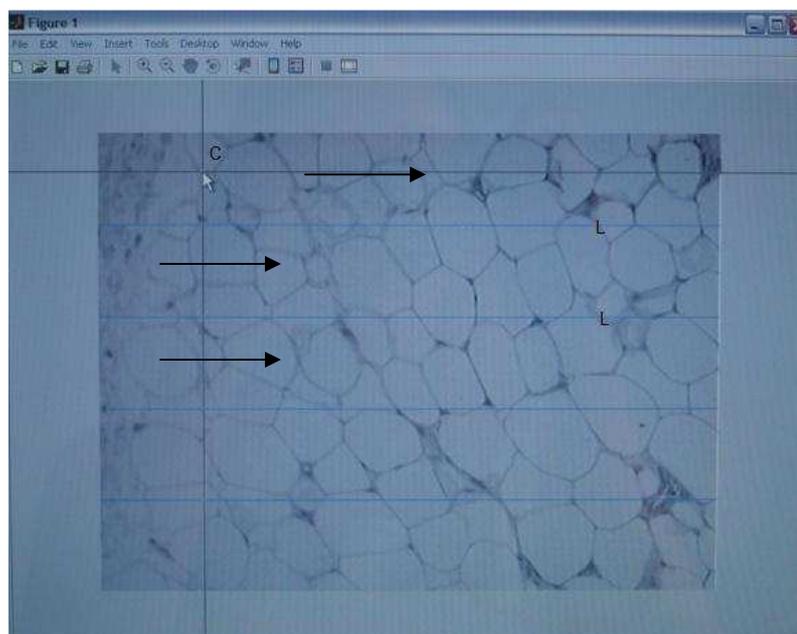


Figura 19. Aplicação do algoritmo, implementado em interface MATLAB 6.5, e metodologia adotada para a medida adipocitária. C – Cursor para a seleção; L– linhas traçadas pelo algoritmo para facilitar a seleção; → seqüência adotada.

A terceira amostra, por sua vez, foi processada no Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os tecidos foram fixados em solução Karnovsky, composta por: glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 4%, CaCl_2 a 1 mM, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 2 h em temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8%, CaCl_2 a 1 mM, por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente. Sequencialmente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato, desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas em misturas de acetona/epon e epon puro, e polimerizadas em estufa a 60° C (Apêndice 2). Os cortes ultrafinos foram efetuados no ultra-micrótomo digital Leica Ultracut R (figura 20A), a 50 nm, e pescados em gradinhas de cobre de 300 mesh (figura 20B).

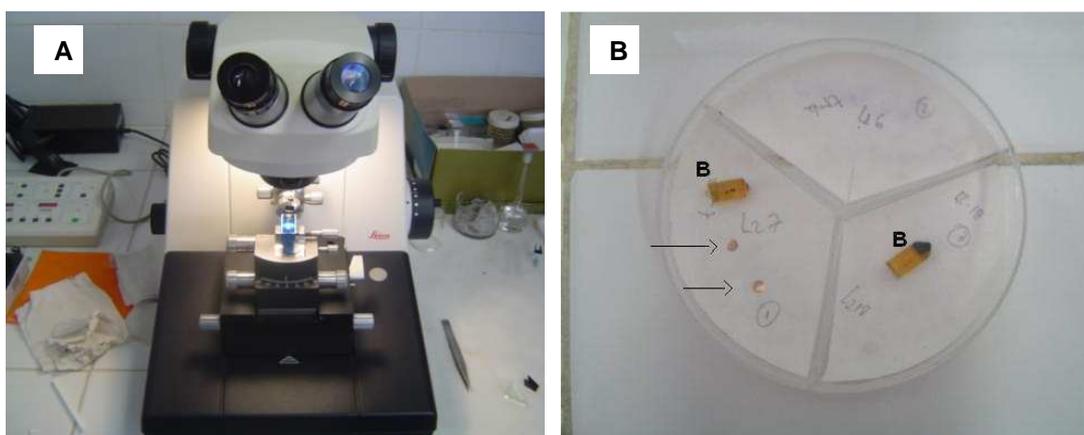


Figura 20. (A) Ultra-micrótomo digital L'eica Ultracut R do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, utilizado para a realização dos cortes semi e ultra-finos. (B) Porta blocos e gradinhas. B – blocos finalizados para o corte no ultramicrotomo. → gradinhas de cobre de 300 mesh com o material coletado.

A contrastação, por fim, foi realizada com citrato de chumbo e acetato de uranila, para posterior análise no microscópio eletrônico de transmissão, Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR (figura 21).



Figura 21. Microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII e equipamentos anexos, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.2.8 Análise estatística

A totalidade do experimento foi realizada e acompanhada pelos pesquisadores com o propósito de minimizar discrepâncias e não comprometer a fidedignidade dos dados.

Os dados foram parametrizados e analisados descritiva e estatisticamente. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. No que tange ao glicérol plasmático, as comparações entre os momentos pré e pós-aplicações, dentro dos grupos, foram realizadas usando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Para as comparações das intensidades do Laser em relação à variação percentual ocorrida após as aplicações, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

O peso e as variáveis histomorfométricas dos animais, para os respectivos grupos, foram analisados por meio do teste t de Student para amostras independentes. O índice de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA PRELIMINAR

No que tange às variáveis histomorfométricas, a figura 22 retrata o número médio de adipócitos uniloculares, por sub-campos de $49.146 \mu\text{m}$, em 5 sub-campos por animal. Esses valores encontraram-se em: $19,16 \pm 2,15$ para o grupo L1, $18,76 \pm 5,03$ para o grupo L2, $18,84 \pm 3,16$ para o grupo L3 e $18,36 \pm 2,37$ para o grupo L4, sem diferença estatisticamente significativa entre eles.

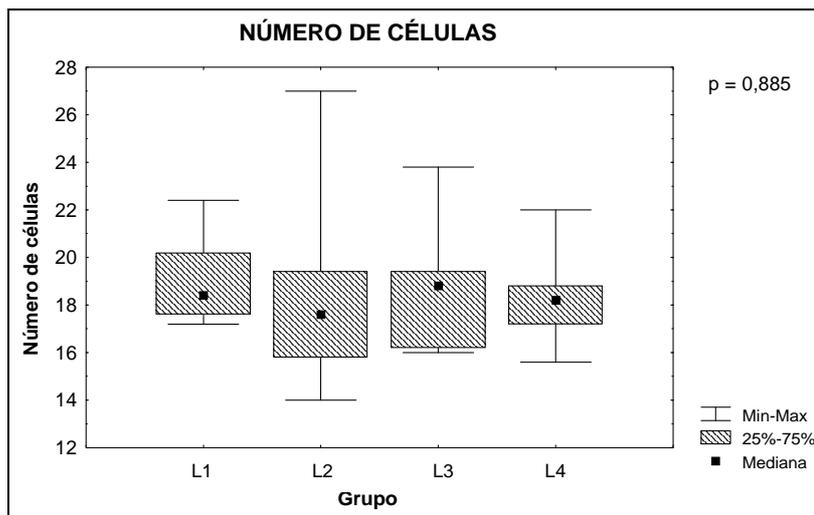


Figura 22. Número de adipócitos uniloculares para os respectivos grupos. Significância estatística avaliada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. L1 – 0,06J, L2 – 0,31J, L3 – 0,62 J, L4 – 0J.

A área média dos adipócitos uniloculares, referente aos grupos submetidos ao Laser de baixa intensidade, com diferentes energias, e ao grupo controle, representada pela figura 23, foi: 3.741 ± 704 pixels, 3.762 ± 974 pixels, 3.737 ± 1.076 pixels e 4.619 ± 781 pixels para os grupos L1, L2, L3 e L4, respectivamente. Em termos numéricos, os grupos submetidos à radiação luminosa apresentaram menor área adipocitária, em relação ao grupo controle, embora sem significância estatística.

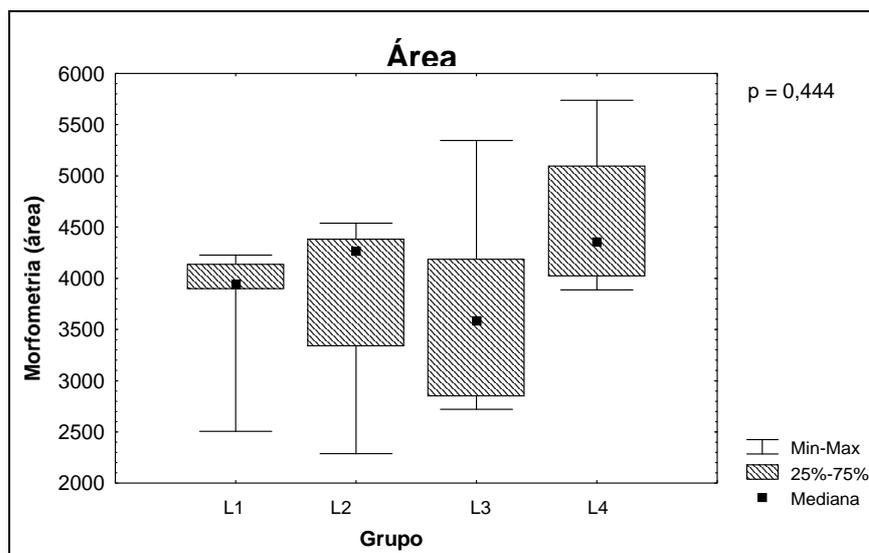


Figura 23. Área, em pixels, dos adipócitos uniloculares para os respectivos grupos. Significância estatística avaliada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. L1 – 0,06J, L2 – 0,31J, L3 – 0,62J, L4 – 0J.

As fotomicrografias do tecido adiposo unilocular de ratos, referentes aos grupos expostos a laserterapia específica e ao grupo controle, são apresentadas na figura 24.

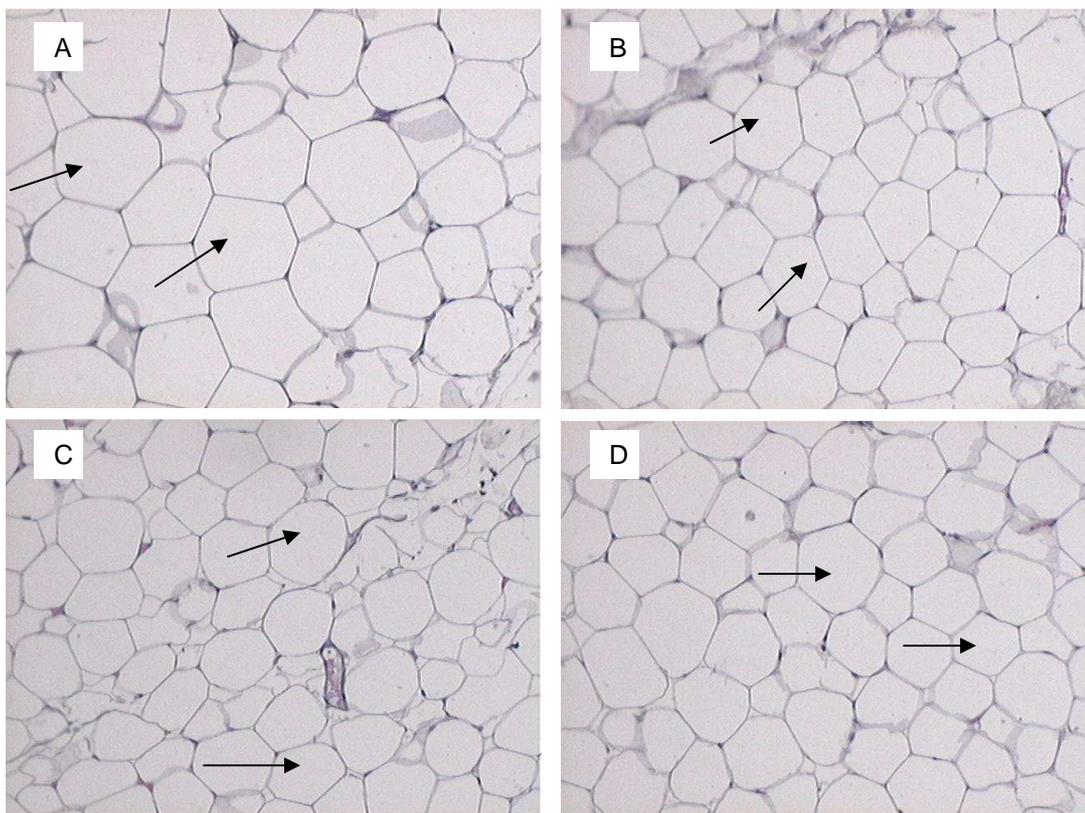


Figura 24. Fotomicrografias de tecido adiposo unilocular de ratos. HE X200. As imagens demonstram células adiposas expostas a: (A) 0J - L4, (B) 0,06J - L1, (C) 0,31J - L2 e (D) 0,62J - L3. → células adiposas uniloculares.

Considerando-se os animais submetidos às energias pontuais de 0,06J; 0,31J e 0,62J como um grupo, grupo estudo, testou-se a hipótese nula de que os resultados para este grupo são iguais aos resultados para o grupo controle, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela 1 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 1 – Comparação morfométrica entre os grupos estudo e controle para o número e área das células. (*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Variável	Grupo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p*
Número de células	Estudo	18,92	18,4	14	27	3,38	0,735
	Controle	18,36	18,2	15,6	22	2,37	
Área	Estudo	3746,87	3941	2287	5346	854,21	0,142
	Controle	4619,00	4357	3887	5737	781,52	
	Controle	0,6149	0,6192	0,5875	0,6453	0,0215	

Assim sendo, os resultados do teste indicaram que não existem diferenças estatisticamente significantes entre o grupo estudo e o grupo controle para as variáveis histomorfométricas. Contudo, pode-se observar uma tendência à rejeição da hipótese nula, para a área dos adipócitos uniloculares, com o aumento do tamanho amostral.

4.2 ESTUDO FINAL

4.2.1 Massa dos animais

A massa média inicial dos animais referentes aos grupos experimental e controle e o valor de p são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Massa média inicial dos animais pertencentes aos grupos experimental e controle, em g. (*) Teste t de Student para amostras independentes.

Grupo	Massa (g)					Valor de p*
	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Experimental	276,76	272	230	346	24,39	0,814
Controle	274,95	270	232	328	25,13	

A inexistência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, frente ao teste t de Student, demonstrou a homogeneidade dos mesmos.

4.2.2 Resultados bioquímicos

O glicerol plasmático médio, pré e pós laserterapia para o grupo E, encontrou-se em $19,89 \pm 6,26$ mg/dl e $24,32 \pm 5,54$ mg/dl, respectivamente, sendo a diferença percentual $29,12 \pm 35,19\%$. Para o grupo C, tal substrato apresentou-se em $19,05 \pm 3,85$ mg/dl e $19,76 \pm 5,92$ mg/dl, respectivamente, sendo a diferença percentual entre eles $5,28 \pm 26,42\%$. Os resultados estatísticos evidenciaram que existe diferença significativa entre os valores de glicerol pré e pós a aplicação do Laser apenas para o grupo E, assim como diferença entre os grupos estudo e controle quanto a variação percentual pré e pós a laserterapia proposta (figura 25).

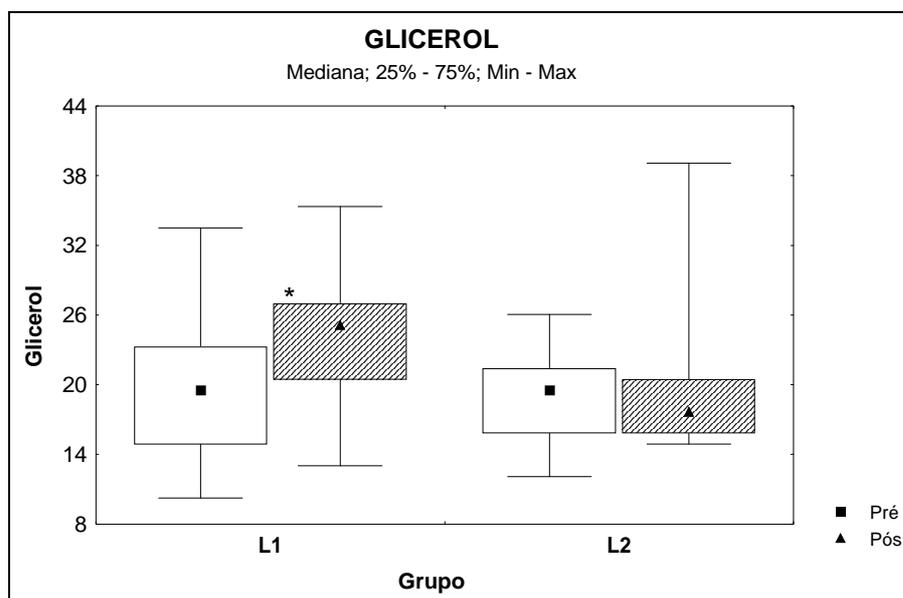


Figura 25. Glicerol plasmático, pré e pós a aplicação do Laser de baixa intensidade, para os respectivos grupos. Significância estatística (*) avaliada pelo Teste não paramétrico de Wilcoxon.

4.2.3 Resultados histomorfométricos

O número médio de adipócitos uniloculares, por 5 sub-campos de 1.747,488 μm , por campo, em 5 campos por animal, foi: $21,49 \pm 2,55$ para o grupo E e $20,86 \pm 1,81$ para o grupo C, sem diferença estatisticamente significativa entre eles (figura 26).

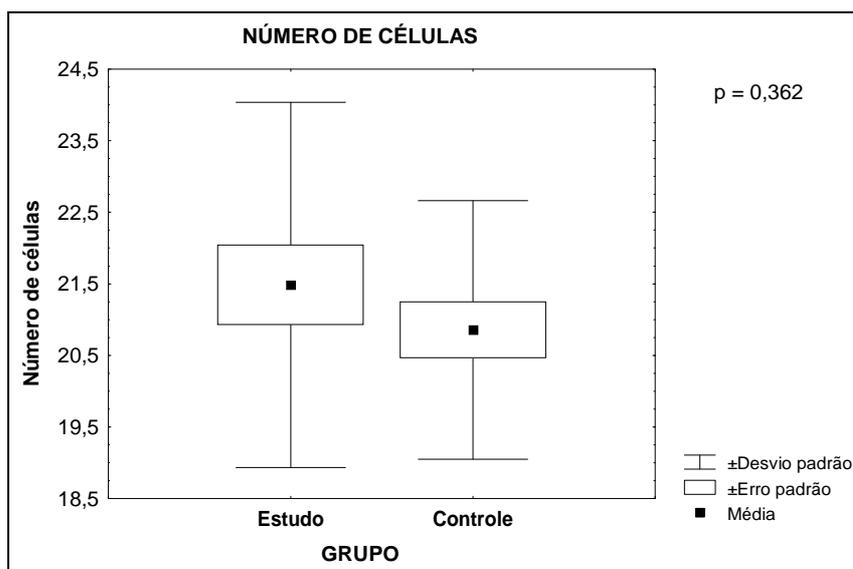


Figura 26. Número de adipócitos uniloculares para os respectivos grupos. Significância estatística avaliada pelo Teste t de Student para amostras independentes.

A área média dos adipócitos uniloculares, referente ao grupo submetido ao Laser de baixa intensidade e ao grupo controle encontrou-se em: 1.773 ± 432 pixels e 2.217 ± 532 pixels, para os grupos E e C, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa entre eles (figura 27).

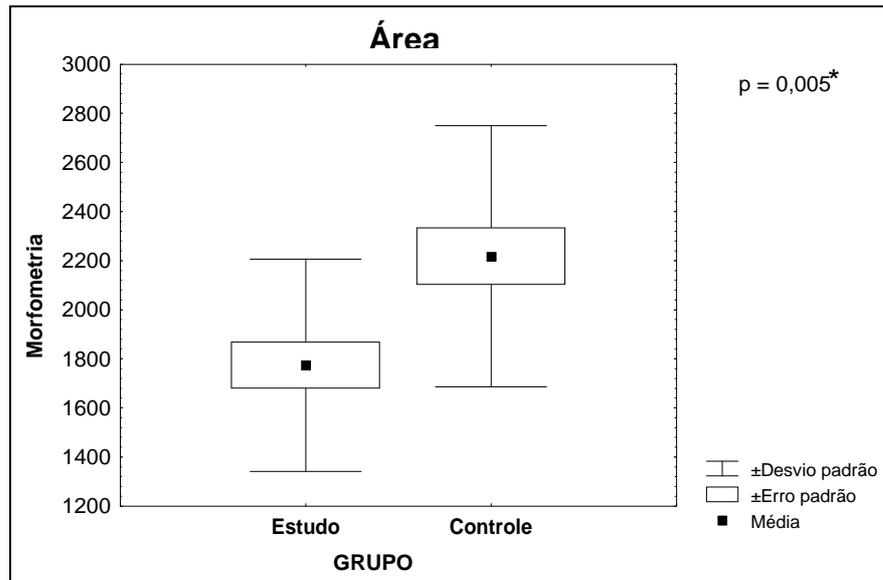


Figura 27. Área dos adipócitos uniloculares para os respectivos grupos. Significância estatística (*) avaliada pelo teste t de Student para amostras independentes.

As fotomicrografias do tecido adiposo unilocular de ratos, referentes aos grupos experimental e controle são apresentadas na figura 28. A histologia evidenciou tecido adiposo unilocular em dois níveis, mais superficial e mais profundo, abaixo da derme. Foram observados, em ambos os grupos avaliados, adipócitos uniloculares, mais especificamente, os locais ocupados pelo lipídio antes da sua dissolução durante a preparação do tecido, representando a quase totalidade da célula, o citoplasma, o núcleo celular e a membrana citoplasmática. As células apresentaram-se volumosas e com diferentes formatos, desde esféricas, poliédricas até achatadas. Quanto à morfometria, foi constatado que os adipócitos pertencentes aos animais do grupo submetido ao Laser de baixa intensidade apresentaram menor área em relação àqueles pertencentes ao grupo controle. No tocante ao meio extracelular, foram visualizados septos de tecido conjuntivo delimitando lóbulos de diferentes tamanhos, vasos sanguíneos, fibroblastos, leucócitos ocasionais e folículos pilosos em diferentes graus de formação.

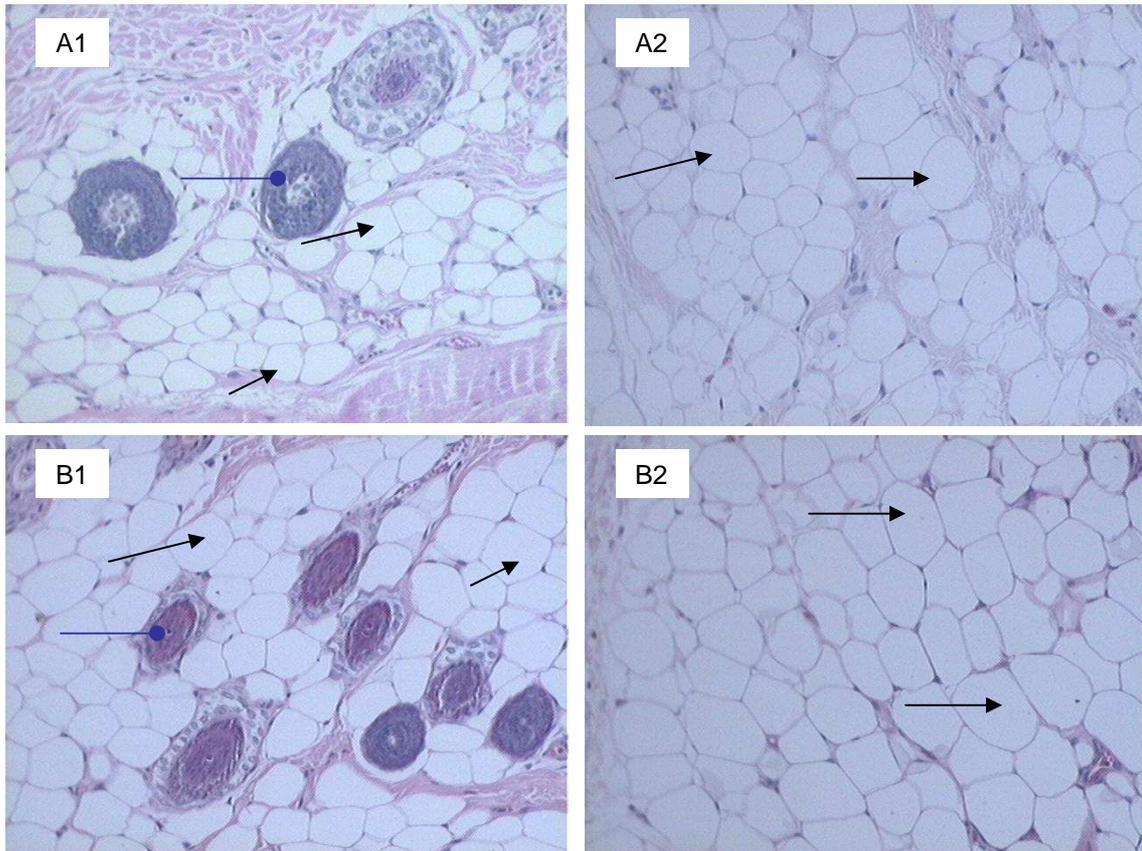


Figura 28. Fotomicrografia de tecido adiposo unilocular de ratos. HE X200. As imagens mostram o tecido adiposo unilocular: (A) submetido a 0,06J por ponto (grupo experimental) e (B) submetido a 0J (grupo controle). 1- tecido adiposo mais superficial, 2- tecido adiposo mais profundo. → Células adiposas uniloculares. ● Folículos pilosos. Pode-se observar que os adipócitos uniloculares do grupo submetido à laserterapia (A) apresentam menor área em relação às células adiposas não irradiadas (B).

4.2.4 Resultados ultra-estruturais

As micrografias eletrônicas evidenciaram uma ou duas células adiposas uniloculares, dependendo do aumento empregado. De modo geral, foram observados a membrana citoplasmática e as organelas celulares, sobretudo as mitocôndrias. Essas organelas, em termos subjetivos, tenderam a se apresentar mais abundantes e em maior tamanho no grupo submetido à laserterapia de baixa intensidade em relação ao grupo controle, alcançando áreas superiores a 26.892 pixels a $1\mu\text{m}$ (figuras 29 e 30).

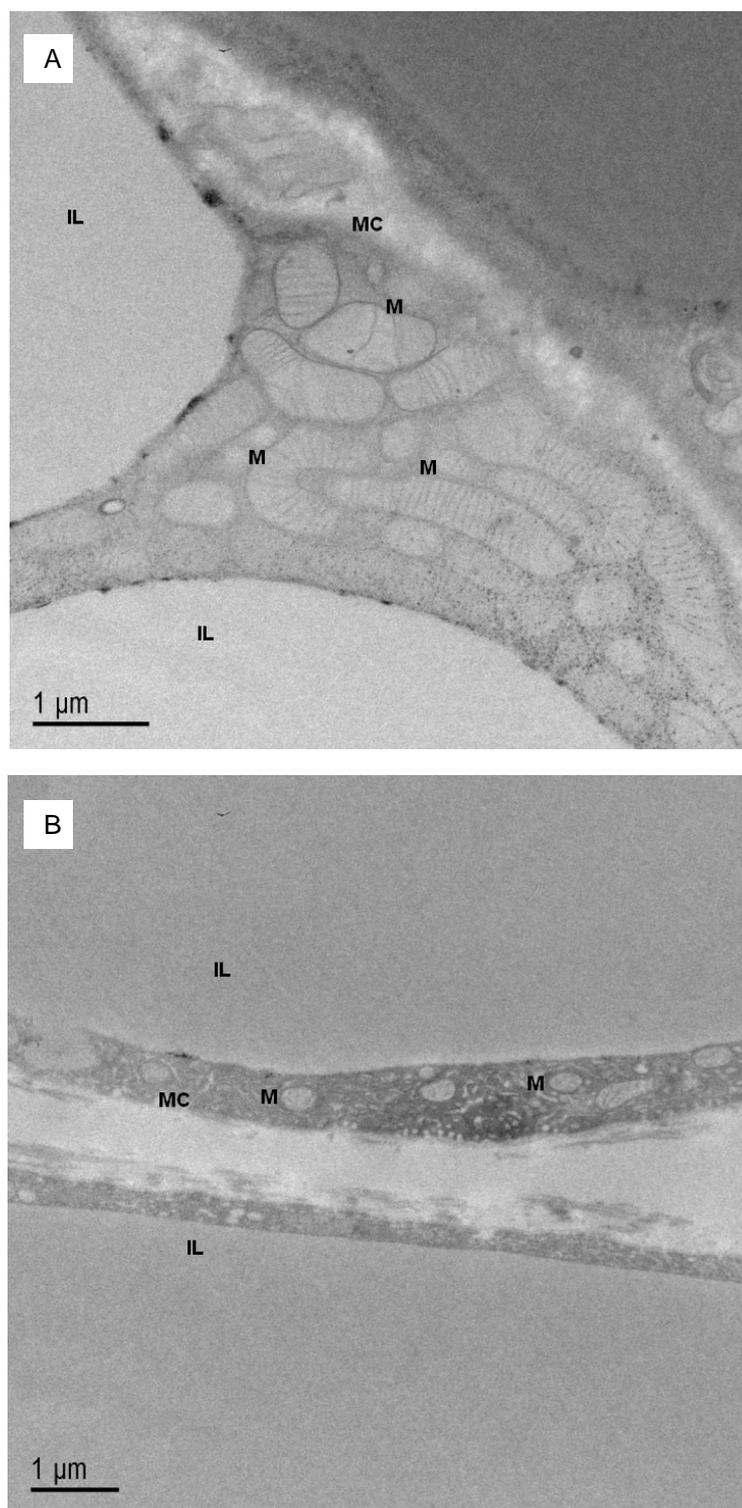


Figura 29. Eletromicrografia de adipócitos uniloculares de ratos. A) grupo experimental e B) grupo controle. IL – inclusão lipídica; MC – membrana citoplasmática; M – mitocôndrias. Pode-se observar que as mitocôndrias pertencentes às células do grupo submetido ao Laser proposto (A) tendem a se apresentar mais abundantes e com maior tamanho em relação às células não irradiadas (B).

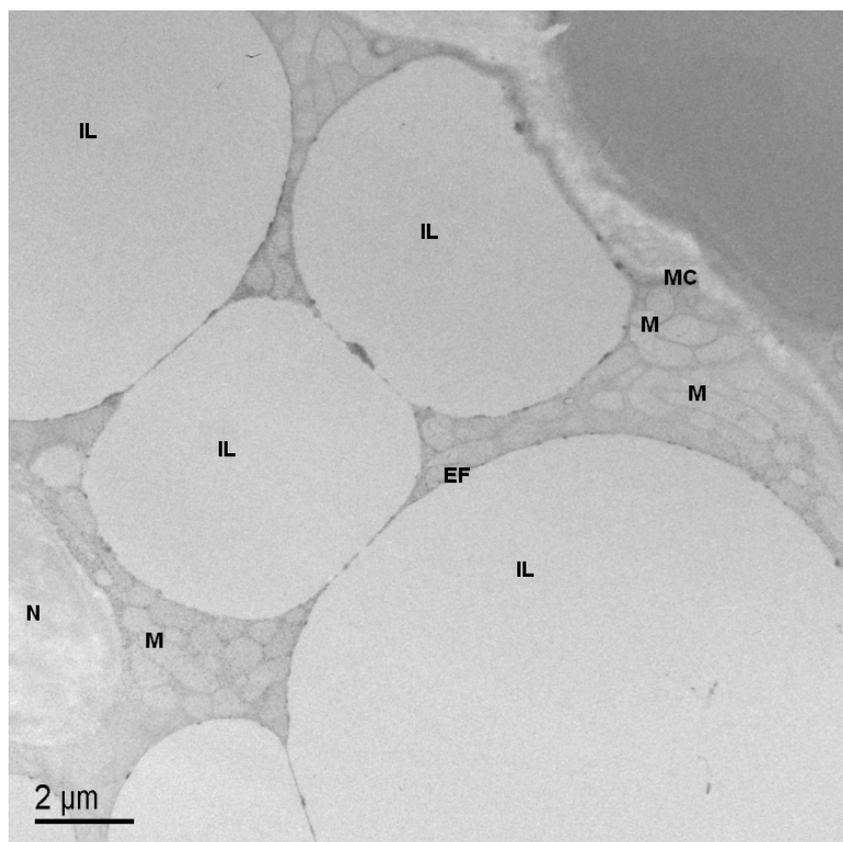


Figura 30. Eletromicrografia de adipócitos uniloculares submetidos ao laser de baixa intensidade. IL – inclusão lipídica; MC – membrana citoplasmática; M – mitocôndria; EF – envelope fenestrado; N – núcleo. A figura mostra a grande quantidade de mitocôndrias circundando as inclusões lipídicas e o núcleo.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

Diversos estudos evidenciaram efeitos da laserterapia terapêutica em fibroblastos (Vinck *et al.*, 2003; Webb e Dyson, 2003; Júnior *et al.*, 2006), macrófagos (Klebanov e Poltranov, 2005), linfócitos (Tong e Liu, 2000), células endoteliais (Schindl *et al.*, 2003) e células específicas dos tecidos ósseo (Freitas *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2003), nervoso (Khullar *et al.*, 1999; Oron *et al.*, 2006), muscular esquelético (Shefer *et al.*, 2002), cardíaco (Drugova e Monich, 2001), cartilaginoso (Yueh-Shuang *et al.*, 2004) e epitelial (Haas *et al.*, 1990; Hsin-Su *et al.*, 2003). No que tange ao tecido adiposo, pouco se sabe a respeito dos efeitos do Laser de baixa intensidade sobre este tecido, pois, embora tal dispositivo seja utilizado há mais de 35 anos, como recurso terapêutico, sua aplicação na tela subcutânea é recente.

O Laser, ao interagir com os tecidos biológicos gera processos fotobiológicos modulatórios e, conseqüentemente, efeitos a nível macroscópico. Tendo em vista a variedade de parâmetros modulatórios e a grande complexidade do tecido adiposo, órgão endócrino envolvido em diversos processos fisiopatológicos, há uma urgente necessidade de informações concernentes às ações específicas desta técnica no mesmo. A presente dissertação vem de encontro a essa necessidade atual, dado que demonstra resultados significativos importantes decorrentes da interação entre a radiação luminosa e o tecido adiposo, por meio de uma metodologia bem fundamentada e estruturada.

5.1 QUANTO AOS RESULTADOS

Os resultados do presente estudo, nas condições propostas, evidenciaram que o Laser de baixa intensidade, com 660 nm e energia de 0,06J por ponto, exerce efeito lipolítico no tecido adiposo unilocular de ratos. Esse efeito foi observado tanto em nível plasmático, com o aumento do glicerol, quanto em nível microscópico e

ultraestrutural, com a redução dos adipócitos uniloculares e tendência ao aumento do número e tamanho das mitocôndrias nos animais submetidos ao Laser de baixa intensidade. Esses achados corroboram com a tendência a redução da área observada no estudo histomorfométrico preliminar, a qual se apresentou independente da energia empregada. Por outro lado, no que tange ao número de células, os resultados de ambos os estudos sinalizaram a não existência de diferenças estatisticamente significantes para esta variável.

Considerando unicamente a avaliação do número e área de células em um dado campo, reduções da área estão relacionadas com aumentos do número de células no campo observado, sem relações diretas com o aumento quantitativo real, visto que há uma redução da espessura do tecido. No presente trabalho, os campos utilizados para a avaliação do número e área dos adipócitos uniloculares foram diferentes, sendo o primeiro bastante pequeno, em relação ao campo total. Neste diapasão, a alteração morfológica evidenciada foi insuficiente para proporcionar uma variação no número de células no campo proposto, justificando os resultados observados.

Em termos fisiológicos, os achados atinentes ao número de adipócitos são fundamentados pelo fato do tecido adiposo, diferentemente dos demais, apresentar uma acentuada capacidade de alterar seu tamanho, podendo elevar seu peso total acima de 100%, ou diminuí-lo, chegando a 3% do normal (Vague, 1991; Trayhurn e Beattie, 2001). Neste sentido, alterações no número de células adipocitárias pressupõem grandes estímulos, uma vez que esta célula, primariamente, sofre outras variações morfológicas. Essas alterações podem ser relativas à lipogênese, onde o aumento de triglicerídeos promove hipertrofia adipocitária, recrutamento de precursores dos adipócitos, diferenciação celular, e aumento quantitativo deste tecido (Spiegelman e Flier, 2001; Chavey *et al.*, 2003); ou alterações em termos lipolíticos, por intermédio da lesão tecidual ou condições específicas, ambas por fatores intrínsecos ou extrínsecos.

No que concerne ao efeito lipolítico observado, a interação entre a molécula fotoceptora e o feixe luminoso envolve quatro processos: a aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória, o incremento na temperatura local dos cromóforos, a geração de oxigênio molecular (ação fotodinâmica) e a liberação de radicais livres no final da cadeia respiratória (Karu, 1999). Em complemento,

Vladimirov *et al.* (2004) relataram que a radiação luminosa promove a fotólise do complexo NO/componentes da cadeia respiratória, liberando o NO e promovendo a restauração e otimização da respiração celular. Além da reativação da Cu-Zn-superóxido dismutase, inativa em baixo pH, e a ação fotodinâmica de sensibilizadores endógenos responsáveis por iniciar os efeitos benéficos mediados pela radiação luminosa de baixa intensidade.

Essas primeiras mudanças nas moléculas fotorreceptoras são seguidas por um conjunto de reações bioquímicas celulares, as quais compreendem a base dos efeitos secundários. Estas reações englobam outras mudanças redox, transdução do foto-sinal e amplificação da cadeia, com a conseqüente modulação das reações bioquímicas e macro-efeitos biológicos. Deste modo, a ativação da cadeia transportadora de elétrons resulta em incrementos no potencial elétrico da membrana mitocondrial, aumento de ATP, redução do pH citoplasmático, dentre outros efeitos, os quais promovem mudanças no fluxo de cálcio entre a mitocôndria e o citoplasma, assim como aumento nas concentrações de AMPc (Karu, 1988; Vladimirov *et al.*, 2004). Assim sendo, a atividade mitocondrial é incrementada, frente à laserterapia de baixa intensidade, justificando a tendência ao aumento do número e da área dessa organela no presente estudo. Neste diapasão, Manteifel *et al.* (1997) observaram o aparecimento de mitocôndrias gigantes, em linfócitos humanos, 1 h após a aplicação do Laser de He-Ne, corroborando os achados demonstrados pela microscopia eletrônica de transmissão.

O aumento do AMPc, no tecido adiposo, promove a ativação da PKA, responsável pela fosforilação da lipase hormônio sensível e da perilipina. A lipase hormônio sensível fosforilada é, então, translocada para a gotícula de gordura, onde a perilipina fosforilada permite seu acesso, ocasionando a hidrólise dos triglicerídeos, logo, lipólise (Cisternas, 2002; Holm, 2003; Hermsdorff e Monteiro, 2004; Wolf, 2005; Marcinkiewicz *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006). Esse é um dos mecanismos possíveis pelo qual o Laser de baixa intensidade promove a redução dos adipócitos uniloculares.

Em complementaridade, o NO, proveniente da fotólise do complexo NO/componentes da cadeia respiratória, poderia auxiliar na redução da área adipocitária, uma vez que esta molécula exerce ações modulatórias sobre a lipólise, tendo em vista seu estado redox (Gaudiot *et al.*, 1998; Gaudiot *et al.*, 2000).

A ação da lipase hormônio sensível, e outras proteínas, sobre a gotícula adiposa promove a hidrólise dos triglicerídeos, os quais são convertidos em diglicerídeos e estes em monoglicerídeos. Os monoglicerídeos, por sua vez, são hidrolizados pela monoglicerídeo lipase, com a conseqüente liberação de ácidos graxos e glicerol que, por sua vez, difundem para os capilares do tecido adiposo e sistema circulatório, de modo geral (Holm, 2003; Dolinsky *et al*, 2004, Junqueira e Carneiro, 2004; Wolf, 2005). O glicerol, bastante solúvel no plasma, é captado, principalmente, pelo fígado e reaproveitado (Junqueira e Carneiro, 2004). Neste aspecto, processos lipolíticos desencadeiam a liberação de ácidos graxos e glicerol para o sistema circulatório, o que fundamenta os achados bioquímicos deste trabalho, mais especificamente, o aumento do glicerol plasmático após a exposição dos animais ao Laser de baixa intensidade.

Além do fígado, outros órgãos estão envolvidos na captação do glicerol plasmático, como os rins, o cérebro, o intestino, os pulmões, dentre outros. A taxa hepática média de extração é estimada em 2 a 4 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$, sendo que concentrações aproximadas de 2 mM/L podem ser completamente reabsorvidas pelo fígado e rins (Lin, 1977). Sloviter (1958) observaram que a administração de soluções contendo baixas concentrações de glicerol, 5%, não causa efeitos tóxicos ou colaterais indesejados. Em contrapartida, soluções com altas concentrações, superiores a 20%, podem produzir hemoglobinúria e dano renal. Nesse ínterim, o incremento nas concentrações de glicerol plasmático após a laserterapia de baixa intensidade, evidenciado pelo presente estudo, encontra-se dentro dos limites de reabsorção pelos órgãos responsáveis, sendo insuficiente para proporcionar efeitos prejudiciais.

5.2 QUANTO AO MÉTODO

O modelo experimental utilizado no presente estudo foi o *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, fêmeas, com 6 meses de vida. Esta seleção decorreu dos resultados obtidos junto ao estudo A, os quais demonstraram que o modelo experimental com essas características apresentava maiores concentrações de adiposidade subcutânea na região torácica dorsal. O

roedor com 6 meses de vida tem o metabolismo mais lentificado em relação aos roedores mais jovens, logo, os resultados do presente estudo sugerem um efeito lipolítico em potencial, pois a laserterapia proposta promoveu incremento nos níveis de glicerol plasmático, redução da área celular e tendência ao aumento do número e tamanho das mitocôndrias nos adipócitos uniloculares em ratos com um metabolismo já lentificado.

Extrapolações de resultados obtidos por estudos envolvendo animais para humanos são limitadas, tendo em vista as peculiaridades de cada organismo. Contudo, os resultados tendem a apresentar semelhanças, as quais podem ser transportadas quase diretamente, de modo a fundamentar o ensaio clínico em seres humanos. Neste sentido a Laserterapia proposta por este estudo mostrou-se promissora em promover efeitos lipolíticos na espécie humana.

Considerando os efeitos do Laser, na modulação dos processos biológicos, a Lei de Arndt-Schultz é proposta como modelo ao prover base teórica para a dosimetria. No âmbito geral, ela caracteriza a bioestimulação em densidades mais baixas e a bioinibição frente a densidades mais altas (Baxter, 2003; Túner e Hode, 2004). O'Kane e Shields (1994), Schindl *et al.* (2003) e Yu e Naim (1997), a partir de seus estudos, sugeriram que a bioestimulação ocorre em densidades de energia entre 0,05 e 10 J/cm². Já Túner e Hode (2004) consideraram a dose ótima para bioestimulação entre 0,5 e 1 J/cm² para lesões abertas e entre 2 e 4 J/cm² para as demais condições. Adicionalmente, os autores ressaltaram a importância do ajuste da densidade de energia, de modo a otimizar o resultado terapêutico, segundo a resposta individual, tendo em vista as inúmeras variáveis passíveis de interferir nestes resultados.

Esta janela biológica tem como fundamento o dano ao fotoceptor, com a conseqüente redução do metabolismo, decorrente do incremento da densidade de energia para além de um determinado limiar, ou a própria destruição dos fotorreceptores e letalidade celular, com incrementos ainda maiores (Karu, 1987). Além disso, tal biomodulação pode ser decorrente das relações entre densidade de energia empregada e mudanças redox, além de outros fatores, uma vez que segundo Karu (1999), mudanças em direção à oxidação são associadas à estimulação da vitalidade celular, enquanto alterações em direção à redução estão relacionadas à inibição dos processos biológicos.

No estudo final, a laserterapia com fluência de 2 J/cm^2 , energia de $0,26 \text{ J}$ por aplicação ou $0,06 \text{ J}$ por ponto, nas condições propostas, foi efetiva de modo a desencadear efeito lipolítico, evidenciando que tal densidade de energia encontra-se dentro dos limites estimulatórios tissulares preconizados pela literatura. Contudo, quanto aos achados do estudo histomorfométrico preliminar, não foi observada diferença significativa, ou mesmo tendências para tal, nos adipócitos uniloculares estimulados com o laser de diodo semiconductor, entre as energias $0,06 \text{ J}$ (2 J/cm^2); $0,31 \text{ J}$ (8 J/cm^2) e $0,62 \text{ J}$ (16 J/cm^2).

A energia no tecido alvo e, conseqüentemente, os resultados terapêuticos relacionam-se com o comprimento de onda, a densidade de potência, o tipo de tecido, as condições tissulares, a natureza da moléstia, a pigmentação tissular, a técnica de aplicação empregada, dentre outros fatores (Guiro e Guiro, 2002c; Baxter, 2003; Túner e Hode, 2004). Neste sentido, os macroefeitos biológicos, relacionam-se diretamente com a profundidade de penetração da radiação luminosa, sendo o espalhamento e a absorção fatores determinantes (Baxter, 1995; Túner e Hode, 2004). O tecido adiposo, por suas características intrínsecas, apresenta uma maior capacidade de penetração da radiação luminosa, indicando uma menor absorção (Stolik *et al.*, 2000).

É provável que as três diferentes energias empregadas no estudo histomorfométrico preliminar encontrem-se dentro dos limites estimulatórios biológicos da curva de Arndt-Schultz, levando-se em consideração a tendência a resultados significativos quando comparados os grupos experimentais em relação ao controle, o que justifica a ausência de diferenças significativas entre as energias $0,06 \text{ J}$; $0,31 \text{ J}$ e $0,62 \text{ J}$.

Por outro lado, a laserterapia de baixa intensidade promove efeitos moleculares, os quais compreendem a base para os macroefeitos biológicos (Letokhov, 1991; Karu, 1999; Baxter, 2003; Nussbaum *et al.*, 2003; Vladimirov *et al.*, 2004). Neste sentido, existe a possibilidade de que o protocolo utilizado no estudo histomorfométrico preliminar não tenha sido suficiente para promover alterações diferenciadas, entre as energias empregadas, a nível histomorfométrico, sendo os efeitos restritos ao nível molecular. Destarte, a análise histomorfométrica empregada não seria suficientemente sensível para detectar tal diferença.

Os resultados obtidos pelos estudos referentes aos efeitos do Laser de baixa intensidade no tecido adiposo são contraditórios. Neira *et al.* (2002) avaliaram os efeitos do diodo Laser, com 635 nm, 10 mW de potência e energias de 1,2J; 2,4J e 3,6J, no tecido adiposo de humanos submetidos à dermolipectomia. A aplicação do Laser foi realizada através da pele íntegra, por meio da técnica de varredura na presença e ausência de técnica tumescente prévia. Esta técnica consiste na infiltração tissular de solução salina associada a um agente anestésico e a um agonista adrenérgico, com o propósito de facilitar o procedimento de lipoaspiração e evitar complicações. Os autores observaram o extravasamento da gordura intracelular para o meio extracelular, em decorrência da presença transitória de poros ou ruptura da membrana citoplasmática, nas células submetidas à estimulação proposta. Estes efeitos foram mais proeminentes com o aumento da energia assim como com o uso da técnica tumescente prévia, culminando em graus diferenciados de perda do formato das células. Partindo destes resultados, Neira *et al.* (2006) descreveram a técnica de liposucção assistida pelo Laser de baixa intensidade, conhecida como técnica 4L de Neira. Esta técnica, segundo esses autores, facilita o procedimento de liposucção, tendo em vista os resultados a nível celular, descritos no estudo anterior (Neira *et al.*, 2002), proporcionando a redução da lesão tissular e do processo inflamatório, bem como a otimização da cicatrização tecidual.

Em contrapartida, Brown *et al.* (2004), na tentativa de alcançar resultados semelhantes aos achados de Neira *et al.* (2002), não obtiveram resultados, frente ao uso do diodo Laser com 635 nm, 10 mW de potência, com uma ampla variedade de densidades de energia, no tecido adiposo de humanos, porcos, ou mesmo em cultura de pré-adipócitos humanos, sob condições diferenciadas. Importa aduzir que, nos diferentes protocolos utilizados, a energia total aplicada pelos autores foi sempre superior à energia total empregada por Neira *et al.* (2002), sendo que, em alguns casos, os autores realizaram aplicações duplas, sendo estas previamente e posteriormente à técnica tumescente. Brown *et al.* (2004), para compreender a grande divergência entre os estudos, realizaram análises duplicadas das amostras, e salientaram a possibilidade dos poros, observados por Neira *et al.* (2002), corresponderem a artefatos ocasionados pela exposição ao Laser e pelo preparo do material. Além disso, os pesquisadores consideraram que apenas efeitos biológicos sutis podem ser influenciados pela laserterapia de baixa intensidade em tecidos

subdérmicos, tendo em vista as limitações de penetração da radiação dentro do espectro vermelho.

Relativamente a esta limitação e considerando que o Laser utilizado pelo presente estudo possui 660 nm de comprimento de onda e 20 mW de potência emitida, comprimentos de onda entre 650 e 1000 nm, apresentam profundidade de penetração de 2 a 3 mm com uma variação máxima de 20 a 30% de indivíduo para indivíduo, tendo em vista as diferenças nas propriedades ópticas tissulares existentes entre os mesmos (Baxter, 1995). Túner e Hode (2004) referiram que um laser de, aproximadamente, 632 nm, com potência emitida de 3,5 mW, penetra até 8 mm, dependendo do tecido estimulado. Além disso, a técnica pontual de aplicação do laser, com a *probe* posicionada perpendicularmente à região proposta associada à discreta compressão tissular, utilizada pelo presente estudo, minimiza os fatores atenuantes da radiação Laser durante a aplicação, aumentando, conseqüentemente, a profundidade de penetração (Baxter, 1995; Nussbaum *et al.*, 2003; Túner e Hode, 2004). Esses dados, associados com os resultados positivos obtidos, indicam que, no presente estudo, a interação entre a radiação luminosa e o tecido alvo de fato ocorreu. Ademais, altas profundidades de penetração da radiação Laser não são necessárias para que haja bioestimulação em tecidos mais profundos, tendo em vista a interação entre o feixe luminoso e os tecidos, o conjunto de reações desencadeadas pelos efeitos primários do Laser (Baxter, 1995; Karu, 1999; Baxter, 2003; Vladimirov *et al.*, 2004), bem como o fenômeno de amplificação da intensidade da radiação luminosa na derme e na epiderme (Schindl *et al.*, 2000; Nussbaum *et al.*, 2003).

Cabe relatar que ambos os estudos citados, Neira *et al.* (2002) e Brown *et al.* (2004), ao contrário do presente experimento, restringiram-se à análise qualitativa, por intermédio da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, limitando, grandemente, a validação dos efeitos do Laser. Em associação a isso, a aplicação foi única, com as diferentes energias propostas. Neste sentido, os resultados obtidos pelos autores referem-se aos efeitos imediatos, de uma única aplicação, do laser avaliado. No presente estudo, os animais foram submetidos à laserterapia proposta 3 vezes por semana, durante 4 semanas, totalizando 12 aplicações. Com isso, objetivou-se a caracterização dos efeitos da laserterapia sobre o tecido adiposo unilocular de modo continuado, simulando um tratamento não-invasivo para redução

de adiposidade localizada. Transpondo as diferenças intrínsecas entre os estudos, os resultados evidenciados pelo presente trabalho, com mesmo direcionamento que os achados de Neira *et al.* (2002), demonstraram diferenças significativas, em termos lipolíticos, no tecido adiposo. Contudo, não foram observadas alterações no formato dos adipócitos uniloculares, nem presença de lipídios no meio extracelular, além da tendência a redução adipocitária observada no estudo histomorfométrico preliminar, ser independente da densidade de energia empregada.

Fodor (2004) relatou não haver explicação para a grande divergência entre os resultados obtidos por Neira *et al.* (2002) e Brown *et al.* (2004), tendo em vista as metodologias utilizadas. E ressaltou que polarizações desta natureza demonstram a importância de adequadas investigações sobre novas técnicas ou novos enfoques das metodologias já existentes, previamente ao uso clínico.

Medrado *et al.* (2006), analogamente a Brown *et al.* (2004), não observaram alterações no tecido adiposo unilocular de ratos, com o uso do Laser de GaAsAl com 670 nm, 9 mW e energia de 0,07J, densidade energética de 1 J/cm^2 , durante 4, 8, 12 ou 16 dias. No entanto, em relação ao tecido adiposo multilocular, foram evidenciados graus variáveis de aumento e fusão dos vacúolos adiposos. Esta alteração foi observada, sobretudo, com 4 e 16 dias de aplicação do laser. Outro achado relativamente constante, citado pelos pesquisadores, foi a congestão vascular com 4, 8 e 12 dias de irradiação tecidual. Frente aos resultados, os autores consideraram o tecido adiposo branco mais resistente à laserterapia de baixa intensidade, em relação ao tecido adiposo marrom. Neste aspecto, levando-se em consideração, unicamente, a alteração em nível multilocular previamente à unilocular, pelas próprias características intrínsecas de cada tecido, o resultado significativo no presente estudo sugere alterações ao nível do tecido adiposo multilocular, embora não avaliado.

Karu (1999), a despeito das controvérsias entre os efeitos do Laser de baixa intensidade, salientou que a ação do laser sobre o estado redox celular, via cadeia respiratória, é um dos fatores que explicam esta divergência, uma vez que células com o estado redox em direção à redução são mais sensíveis aos efeitos da radiação luminosa. Neste sentido, importa ressaltar que comparações exatas, entre os estudos, são difíceis, tendo em vista a grande variedade de parâmetros modulatórios de aplicação da laserterapia de baixa intensidade, a insuficiência na

decrição metodológica de muitos trabalhos de modo a permitir sua reprodutibilidade, bem como a grande quantidade de fatores passíveis de interferir na aplicação de tal dispositivo terapêutico.

Os resultados evidenciados pela presente dissertação denotam uma grande aplicabilidade da tecnologia Laser nas áreas dermatofuncional e correlatas, onde diversas técnicas terapêuticas são desenvolvidas e utilizadas, objetivando promover ou auxiliar a redução da adiposidade corpórea, sendo, muitas delas, carentes de comprovação científica. É uma área em ascensão, dado a existência de mais de um bilhão de indivíduos acima do peso e a grande quantidade de pessoas com peso dentro dos padrões de normalidade, ou mesmo com baixo peso, acometidas por deformidades do contorno corpóreo, associada à hodierna hipervalorização estética. Além disso, a distribuição e a mobilização da tela subcutânea são desiguais, tornando algumas regiões fortemente resistentes à lipólise, sendo estas altamente beneficiadas com a aplicação localizada de uma técnica comprovadamente lipolítica. Os efeitos adipocitários alcançados por intermédio do Laser de baixa intensidade são obtidos com custo relativamente baixo, de maneira conservadora, rápida e praticamente sem efeitos colaterais, o que incrementa, grandemente, os benefícios de tal tecnologia tanto para o cliente, quanto para o proprietário do estabelecimento clínico e profissionais da área da saúde reponsáveis pela aplicação de tal técnica terapêutica.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

A partir dos resultados evidenciados pela presente dissertação, pode-se concluir que a aplicação do Laser de In-Ga-Al-P com 660 nm, energia de 0,06J por ponto (2 J/cm^2), 22,15 mW, em uma frequência de 3 vezes por semana, totalizando 12 aplicações, em *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem *Wistar*, adultos, fêmeas e com seis meses de vida, promove:

- (1) aumento nas concentrações de glicerol plasmático;
- (2) redução dos adipócitos uniloculares de ratos, sem interferir no número de células adiposas e,
- (3) tendência ao incremento no número e tamanho das mitocôndrias.

Os achados ultraestruturais justificam os microscópicos e ambos fundamentam os bioquímicos. São resultados promissores, os quais posicionam o Laser de baixa intensidade como uma importante ferramenta no auxílio à redução adipocitária.

CAPÍTULO 7

SUGESTÕES, PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No que tange à sugestões para a melhoria do presente estudo, cabe enfatizar a avaliação ultraestrutural realizada. Uma avaliação quantitativa da área e número das mitocôndrias proporcionaria um resultado mais concreto, em detrimento da tendência observada na presente dissertação, frente a análise qualitativa realizada. Além disso, a avaliação morfométrica das inclusões lipídicas, bem como a investigação de outras organelas citoplasmáticas fundamentaria ainda mais os efeitos ultraestruturais da radiação luminosa no tecido adiposo.

Diante dos achados evidenciados pelo presente trabalho e considerando a polarização hodierna presente na literatura, estudos futuros são necessários para a caracterização dos reais efeitos da laserterapia de baixa intensidade no tecido adiposo. Interessa enfatizar os estudos em humanos com diferentes protocolos de aplicação da radiação luminosa, como diferentes comprimentos de onda, potência, densidades energéticas, dentre outros parâmetros modulatórios, assim como com diferentes frequências e intervalos de aplicação.

O tecido adiposo de humanos apresenta algumas peculiaridades quando relacionado com o tecido adiposo de ratos, mas, de modo geral, os resultados de um protocolo utilizado em ratos tendem a demonstrar semelhanças com aqueles decorrentes da aplicação em humanos. Um fator importante a ser observado, consiste na diferença de profundidade que o feixe luminoso precisa ultrapassar para alcançar o tecido alvo em ratos e em humanos, em associação às profundidades de penetração da radiação luminosa nas diferentes faixas do espectro eletromagnético, e aos demais parâmetros modulatórios empregados. Destarte, estudos em humanos envolvendo diferentes variáveis relacionadas com a profundidade da radiação Laser proporcionarão uma maior efetividade da terapia. Vale citar que altas profundidades de penetração não são necessárias para estimular efeitos em tecidos mais profundos. Outrossim, a densidade de energia empregada é essencial na laserterapia, tendo em vista o efeito biofotomodulador, fundamentada pela Lei de Arndt-Schultz, onde altas densidades energéticas são inibitórias e baixas fluências

são estimulatórias. No que concerne a esta variável, é importante a investigação do limite estimulatório para o tecido adiposo, assim como da fluência ideal, de modo a proporcionar efeitos mais pronunciados. A frequência e o intervalo de aplicação, por fim, são também relevantes, pois propiciam o conhecimento dos efeitos da laserterapia de modo continuado ou por um curto período de tempo, com os diferentes intervalos de aplicação. Neste diapasão, os resultados dos estudos em humanos permitirão a aplicabilidade imediata da técnica, de modo a proporcionar resultados otimizados.

No que tange à avaliação em si, estudos envolvendo tanto os aspectos moleculares e ultraestruturais quanto os efeitos a nível macroscópico são importantes para a adequada caracterização dos efeitos do Laser de baixa intensidade no tecido adiposo. Inicialmente, é mais interessante averiguar os resultados macroscópicos, pois estes oferecem vantagens imediatas para a prática clínica. Tais resultados podem ser avaliados por meio de diversas técnicas, a saber: cirtometria, ultra-som, termografia, ou mesmo análises bioquímicas, como avaliação do glicerol plasmático ou ácidos graxos livres, dentre outras técnicas avaliativas. Após a avaliação macroscópica é importante investigar os efeitos em níveis microscópico e ultraestrutural, de modo a fundamentar os macro-efeitos observados.

O Laser de baixa intensidade é uma tecnologia multifacetária, com diversas aplicações na área da saúde. Contudo, no que tange ao tecido adiposo, seus reais efeitos não são bem determinados e o mundo científico carece de estudos envolvendo a tecnologia Laser nesse tipo de tecido. Essa situação decorre, sobretudo, do caráter recente da aplicação neste tecido, da complexidade do tecido adiposo, da divergência dos resultados obtidos pelos trabalhos descritos na literatura, da insuficiência na descrição metodológica de muitos deles, assim como da variedade tanto de parâmetros modulatórios quanto de outras variáveis passíveis de interferir nesta terapia. A aplicabilidade desta modalidade terapêutica na tela subcutânea apresenta um grande potencial clínico, considerando, por um lado, a existência de mais de um bilhão de indivíduos adultos acima do peso e a grande quantidade de pessoas com peso dentro dos padrões de normalidade, ou mesmo com baixo peso, acometidas por deformidades do contorno corpóreo. E por outro lado, a distribuição e a mobilização desiguais da tela subcutânea, o que torna algumas regiões fortemente resistentes a mobilização lipolítica, sendo, portanto,

beneficiadas com a aplicação localizada da radiação luminosa. Ademais, esses efeitos do Laser de baixa intensidade sobre o tecido adiposo são obtidos com custo relativamente baixo, de maneira conservadora, rápida e sem efeitos colaterais, se aplicada por um profissional competente. Neste sentido, o presente estudo vem a auxiliar na determinação dos reais efeitos do Laser de baixa intensidade no tecido adiposo, revelando resultados promissores e proporcionando perspectivas de trabalhos futuros, com o propósito de fundamentar, incrementar e inserir tal tecnologia na prática clínica.

REFERÊNCIAS

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE (ICOVGAN). **Nomina anatômica veterinária**. Sapporo: Editorial Committee Hanover, 2005. Disponível em http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2005.pdf. Acesso em: 15 out. 2007.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2004.

ARNER, P. Regulation of lipolysis in fat cells. **Diabetes Ver.** v.4, n.1, p.450-463, 1996.

ARNER, P.; KRIEGHOLM, E.; ENGFELDT, P. In vivo interactions between beta-1 and beta-2 adrenoceptores regulate catecholamine tachyphilaxia in human adipose tissue. **J Pharmacol Exp Ther.** v.259, n.1, p.317-322, 1991.

BARTNESS, T. J.; BAMSHAD, M. Inervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. **Am J Physiol.** v.275, n.1, p.1399-1411, 1998.

BAXTER, D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. London: Churchill Livingstone, 1995.

BAXTER, D. Laserterapia de baixa intensidade. In: KITCHEN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; IVERSEN, V. V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **Br J Sports Med.** v.40, n.1, p.76-80, 2006.

BOS, G. *et al.* Opposite contributions of trunk and leg fat mass with plasma lipase activities: the horn study. **Obes Res.** v.13, n.10, p.1817-23, 2005.

BROWN, S. A. *et al.* Effect of low-level laser therapy on abdominal adipocytes before lipoplasty procedures. **Plast Reconstr Surg.** v.113, n.6, p.1796-804; discussion 1805-6, 2004.

CARVALHO, P. T. C. *et al.* Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta cir bras.** v.21, n.3, p.177-83, 2006.

CHAVEY, C. Y.; MARI, B.; MONTHOVEL, M. Matriz metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. **J Biol Chem.** v.278, n.14, p.11888-11896, 2003.

CISTERNAS, J. R. Fisiologia do tecido adiposo e leptina. In: _____. **Tratado de fisiologia aplicada na saúde**. São Paulo: Robe 2002.

CLAUSELL, N.; TAVARES, A. M. V. O papel dos PPARs nas Doenças Cardiovasculares: aspectos patogênicos na aterosclerose e insuficiência cardíaca e suas implicações clínicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**. v.13, n.3, p.2-4, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Princípios éticos na experimentação animal**. São Paulo, 1991.

COLLS, J. **La terapia Láser, hoy**. Barcelona: Mallorca 206, 1984

CUSHMAN, S. V. Structure-function relationships in the adipose cell. I - Ultrastructure of the isolated adipose cell. **J Cell Biol**. v.46, n.2, p.326-41, 1970.

DELGADO, D. Z. A. Entre la delgadez y la obesidad. **Na Venez Nutr**. v.18, n.1, p.110-112, 2005.

DESIMONE, N. A.; CHRISTIANSEN, C.; DORE, D. Bactericidal effect of 0,95 mW Helium-Neon and 5-mW Indium-Gallium-Aluminum-Phosphate laser irradiation at exposure times of 30, 60, and 120 seconds on photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Physical Therapy**. v.79, n.9, p.839-46, 1999.

DOLINSKY, V. W.; Gilham, D.; ALAM, M. Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism. **Cell Mol Life Sci**. v.61, n.13, p.1633-1651, 2004.

DRUGOVA, V. O.; MONICH, V. A. Effects of red light on postischemic myocardium during reperfusion. **Bull Exp Biol Med**. v.131, n.4, p.325-26, 2001.

EISBERG, R.; Resnick, R. **Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. Rio de Janeiro: Campus, 1979

FARNIER, C. *et al.* Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v.27, n.10, p.1178-86, 2003.

FODOR, P. B. Discussion: effect of low-level laser therapy on abdominal adipocytes before lipoplasty procedures. **Plast Reconstr Surg**. v.113, n.6, p.1805-6, 2004.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.50, n.2, p.216-29, 2006.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Laser effect on osteogenesis. **Appl Surf Sci**. v.154, n. 1, p.548-54, 2000.

GARCIA, M. P.; CHAVES, S.; AZEVEDO, R. B. O tecido adiposo. In: _____. **Entendendo a gordura**. São Paulo: Manole, 2002.

GAUDIOT, N. *et al.* Modulation of White Adipose Tissue Lipolysis by Nitric Oxide. **J Biol Chem.** v.273, n.22, p.13475-81, 1998.

GAUDIOT, N. *et al.* Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.279, n.5, p.1603-10, 2000.

GENESER, F. **Histologia.** 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003

GHAMSARI, S. M. *et al.* Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle. **Vet Surg.** v.26, n.2, p.114-20, 1997.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding Adipocyte Differentiation. **Physiol Rev.** v.78, n.3, p.783-809, 1998.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fibro edema gelóide (celulite). In: _____. **Fisioterapia dermatofuncional.** São Paulo: Manole, 2002a.

_____. Fontes de energia. In: _____. **Fisioterapia dermatofuncional.** São Paulo: Manole, 2002b.

_____. Laser. In: _____. **Fisioterapia dermatofuncional.** São Paulo: Manole, 2002c.

_____. Noções de citologia e histologia. In: _____. **Fisioterapia dermatofuncional.** São Paulo: Manole, 2002d.

GULSOY, M.; OZER, H. G.; BOZKULAK, O. The biological effect of 632,8 nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **J Photochem Photobiol B.** v.82, n.3, p.199-202, 2006.

HAAS, A. F. *et al.* Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** v.94, n.6, p.822-6, 1990.

HATAKOSHI, G. *et al.* Short-Wavelength InGaAlP Visible Laser Diodes. **IEEE J Quantum electronics.** v.27, n.6, p.1476-82, 1991.

HECHT, E. Óptica moderna: lasers e outros temas. In: _____. **Óptica.** 2^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.48, n.6, p.803-811, 2004.

HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Bioch Soc Trans.** v.31, n.6, p.1120-1124, 2003.

HOPKINS, J. T. *et al.* Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **Journal of Athletic Training**. v.39, n.3, p.223-29, 2004.

HSIN-SU, Y. *et al.* Helium-Neon Laser Irradiation Stimulates Migration and Proliferation in Melanocytes and Induces Repigmentation in Segmental-Type Vitiligo. **Journal of Investigative Dermatology**. v.120, n.1, p.56-64, 2003.

JENSEN, M. Lipolysis: contribution from regional fat. **Annu Rev Nutr**. v.17, n.1, p.127-139, 1997.

JÚNIOR, A. M. R. *et al.* Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An bras dermatol**. v.81, n.2, p.150-56, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido adiposo. In: _____. **Histologia básica**. 10ª ed. São Paulo: Guanabara koogan, 2004.

KAHN, J. Radiation. In: _____. **Principles and practice of electrotherapy**. New York: Livingstone, 1994.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE J Quantum electronics**. v.23, n.10, p.1703-1722, 1987.

_____. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life sci**, v.2, n.1, p.53-74, 1988.

_____. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B Biol**. v.49, n.1, p.1-17, 1999.

KARU, T. *et al.* Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surg Med**. v.36, n.4, p.307-14, 2005a.

KARU, T.; PYATIBRAT, L. V. *et al.* Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation **J Photochem Photobiol B**. v.81, n.2, p.98-106, 2005b.

KAVIANI, A. *et al.* Low-level laser therapy in management of postmastectomy lymphedema. **Lasers Med Sci**. v.1, n.2, p.90-4, 2006.

KAWAGUSHI, N., SUNDBERG, C.; KUEIBORG, M. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating β 1 integrin function. **J Cell Sci**. v.116, n.Pt19, p.3893-3904, 2003.

KERSTEN, S. *et al.* Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator - activated receptor target gene. **J Biol Chem**. v.275, n.1, p.28488-93, 2000.

KHULLAR, S. M. *et al.* Enhanced Sensory Reinnervation of Dental Target Tissues in Rats Following Low Level Laser (LLL) Irradiation. **Lasers Med Sci.** v.14, n.3, p.177-84, 1999.

KLEBANOV, I. G.; POLTRANOV, E. A. Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne laser irradiation. **Biochemistry.** v.70, n.12, p.1335-1340, 2005.

KLEPPNER, D. Relendo Einstein sobre radiação. **Rev Bras Ens Fis.** v.27, n.1, p.87-91, 2005.

KOUTNÁ, M.; JANISC, R.; VESELSKÁ, R. Effects of low-power laser irradiation on cell proliferation. **Scripta medica (BRNO).** v.76, n.3, p.163-172, 2003.

KRUG, A. W.; EHRHART-BORNSTEIN, M. Newly discovered endocrine functions of white adipose tissue: possible relevance in obesity-related diseases. **Cell Mol Life sci.** v.62, n.12, p.1359-62, 2005.

LANG, R. J. Semiconductor lasers: an overview of commercial devices. In: **Photonics. The photonics design and applications handbook.** EUA: Laurin, 2002.

LARGE, V.; ARNER, P.; REYNISDOTTIR, S. Hormone-sensitive lipase expression and activity in relation to lipolysis in human fat cells. **J Lipid Res.** v.39, n.8, p.1688-1695, 1998.

LEE, C. H.; OLSON, P.; EVANS R. M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology.** v.144, n.6, p.2201-07, 2003.

LEE, S. C.; PAPPONE, P. A. Membrane responses to extracellular ATP in rat isolated white adipocytes. **Pflugers Arch.** v.434, n.4, p.422-428, 1997.

LEKSTROM-HIMES, J.; XANTHOPOULOS, K. G. Biological Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Family of Transcription Factors. **J Biol Chem.** v.273, n.44, p.28545-48, 1988.

LETOKHOV, V. S. Effects of transient local heating of spatially and spectrally heterogeneous biotissue by short laser pulses. **Nuovo Cimento D.** v.13, n.7, p.939-948, 1991.

LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Ann Rev Biochem.** v.46, n.1, p.765-95, 1977.

LOPES, C. O.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A. Prevenção da xerostomia e da mucosite oral induzida por radioterapia com uso do laser de baixa potência. **Radiol Bras.** v.39, n.2, p.131-36, 2006.

LOUIS, N. S.; JACKMAN, P. G. Role of β -adrenergic receptor subtypes in lipolysis. **Cardiovasc Drugs Ther.** v.14, n.6, p.565-577, 2000.

LOW, J.; REED A. Laserterapia. In: _____. **Eletroterapia explicada**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2001.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J Photochem Photobio B**. v.38, n.1, p.25-30, 1997.

MARCINKIEWICZ, A. *et al.* The phosphorylation of serine 492 of Perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion. **J Biol Chem**. v.281, n.17, p.11901-09, 2006.

MARCON, K.; SANFELICE, A E. Efeitos do laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. **Rev Fisioter FURB**. v.1, n.1, p.1-8, 2005.

MARINO, J. A. *et al.* Efeito do laser terapêutico de baixa potencia sobre o processo de reparacao ossea em tíbia de rato. **Rev bras fisioter**. v.7, n.2, p.167-73, 2003.

MARION-LATARD, F.; GLISEZINKSI, I.; CRAMPES, F. A single bout of exercise induces B -adrenergic desensitization in human adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.280, n.1, p.166-173, 2001.

MAURIÈGE, P.; IMBEAULT, P. Subcutaneous adipose tissue metabolism at menopause: importance of body fatness and regional fat distribution. **J Cli Endocrinol Metab**. v.85, n.7, p.2446-54, 2000.

MEDRADO, A. P. *et al.* Action of low-level laser therapy on living fatty tissue of rats. **Lasers Med Sci**. v.21, n.1, p.19-23, 2006.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 3ª ed. São Paulo: Michalany LTDA, 1998.

MOHAMMED-IHSAN, F. R. Low-Level Laser Therapy Accelerates Collateral Circulation and Enhances Microcirculation. **Photomed Laser Surg**. v.23, n.3, p.289-294, 2005.

MOTTAGUI-TABAR, S.; RYDÉN, M. Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. **Diabetologia**. v.46, n.6, p.789-797, 2003.

NAKAJIMA, I. *et al.* Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. **Differentiation**. v.63, n.4, p.193-200, 1998.

NEIRA, R. *et al.* Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. **Plast Reconstr Surg**. v.110, n.3, p.912-22; discussion 923-5, 2002.

NEIRA, R. *et al.* Low-Level Laser-Assisted Liposuction: the Neira 4 L Technique. **Clin Plastic Surg**. v.33, n.1, p.117-27, 2006.

NUSSBAUM, E. L.; BAXTER, D.; LILGE, L. A review of laser technology and light-tissue interactions as a background to therapeutic applications of low intensity lasers and other light sources. **Phys Ther Rev**. v.8, n.1, p.31-44, 2003.

O'KANE, S.; SHIELDS, D. T. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the hematopoietic cell lines. **Lasers Surg Med.** v.14, n.1, p.34-39, 1994.

Oishi, Y. *et al.* Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. **Cell Metabol.** v.1, p.27-39. 2005.

OLSON, S. M. Bioenergia e metabolismo oxidativo. In: _____. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas.** 4ª ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 1998.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina.** 2ª ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995

ORON, A. *et al.* Low-Level Laser Therapy Applied Transcranially to Rats After Induction of Stroke Significantly Reduces Long-Term Neurological Deficits. **Stroke.** v.37, n.10, p.2620-24, 2006.

PEREIRA, L. O.; Francichi, R. P.; LANCHETA, A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.47, n.2, p.111-127, 2003.

PINFILDI, C. E. *et al.* Helium-Neon laser in viability of random skin flap in rats. **Lasers in surgery and medicine.** v.37, n.1, p.74-7, 2005.

PINHEIRO, A. L. B. *et al.* Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz dent j.** v.14, n.3, p.177-81, 2003.

PITANGUY, I. *et al.* Aspectos atuais da lipodistrofia trocântérica e interfemorais. **Rev bras cir.** v.77, n.3, p.181-194, 1987.

PUGLIESE, L. S. *et al.* The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui odontol bras.** v.17, n.4, p.307-13, 2003.

QADRI, T. *et al.* The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. **J Clin Periodontol.** v.32, n.7, p.714-19, 2005.

QUISTH, V. *et al.* Major differences in noradrenaline action on lipolysis and blood flow rates in skeletal muscle and adipose tissue in vivo. **Diabetologia.** v.48, n.5, p.946-953, 2005.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: the adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology.** v.144, n.9, p.3765-73, 2003.

RIBEIRO, A. F.; PACHECO, M. T. Utilização do laser de baixa potência em indivíduos com quadro álgico que apresentam diagnóstico de disfunção temporomandibular. **Rev soc bras laser.** v.3, n.8, p.25-6, 2003.

RODRÍGUEZ, U. M.; MACARULLA, T. M. Lipolysis induced by leptin in rat adipose tissue from different anatomical locations. **Eur J Nutr.** v.42, n.3, p.149-153, 2003.

ROSEN, E. D. *et al.* PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. **Molecular Cell.** v.4, n.4, p.611-17, 1999.

ROSS, M. H.; REITH, E. J. **Histologia: texto e atlas.** São Paulo: Panamericana, 1993.

ROWRELL, L. J.; REITH, E. J.; ROSS, M. H. **Histologia: texto e atlas.** 2^a ed. São Paulo: Panamericana, 1993.

RUSSO, R. Imagem corporal: construção através da cultura do belo. **Mov Percep.** v.5, n.6, p.80-90, 2005.

SANDOVAL-ORTIZ, M. C. *et al.* Influência do laser de baixa potência nos níveis das proteínas plasmáticas de coelhos. **Rev bras fisioter.** v.7, n.3, p.187-94, 2003.

SATELLITE IMAGING CORPORATION (SIC). **Electromagnetic spectrum.** Disponível em: www.satimagingcorp.com/characterization-of-satellite-remote-sensing-systems.html. 2001. Acesso em 15 mai. 2008.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L. Direct stimulatory effect of low intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol.** v.148, n.2, p.334-336, 2003.

SCHINDL, A. *et al.* Low-intensity laser therapy: a review. **J Invest Med.** v.48, n.5, p.312-326, 2000.

SCHINDL, A. *et al.* Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. **Diabetes care.** v.21, n.4, p.580-4, 1998.

SHEFER, G. *et al.* Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci.** v.115, n.Pt7, p.1461-69, 2002.

SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A. D.; DEPOLO, A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **J Clin Laser Med Surg.** v.18, n.2, p.67-73, 2000.

SLOVITER H. A. Effects of the intravenous administration of glycerol solutions to animals and man. **J Clin Invest.** v.37, n.5, p.619-26, 1958.

SOUZA, M. S. S. *et al.* Relação entre adiponectina e distúrbios metabólicos. **Femina.** v.32, n.10, p.847-850, 2004.

SPIEGELMAN, M. B.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell.** v.104, n.4, p.531-543, 2001.

STOLIK, S. *et al.* Measurement of the penetration depths of red and near infra red light in human "ex vivo" tissues. **J Photochem Photobiol B.** v.57, n.2-3, p.90-3, 2000.

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GAAS (904 nm). **Acta cir bras.** v.13, n.2, p.86-93, 1998.

TCHKONIA, T. *et al.* Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.288, n.1, p.E267-77, 2005.

TIPLER, A. P. **Física: eletricidade, magnetismo, ótica.** vol. II. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

TONG, M.; LIU, Y. Effects of different wave lengths of low level laser irradiation on murine immunological activity and intracellular Ca²⁺ in human lymphocytes and cultures cortical neurogliaocytes. **Lasers Med Sci.** v.15, n.3, p.201-206, 2000.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. Metabolismo. In: _____. **Princípios de anatomia e fisiologia.** 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc.** v.60, n.3, p.329-339, 2001.

TRAYHURN, P. *et al.* Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? **Proceed Nutr Soc.** v.57, n.1, p.413-419, 1998.

TRAYHURN, P.; DUNCAN, J. S.; RAYNER, D. U. Acute cold- induced supression of ob (obese) gene-expression in white aipose-tissue of mice - mediation by the sympathetic system. **Biochem J.** v.311, n.1, p.729-733, 1995.

TÚNER, J.; HODE, L. **The laser therapy handbook.** Tallinn: Prima Book, 2004

VAGUE, P. Insulin resistance: a unifying concept. **Diabete metab.** v.17, n.1, p.75-77, 1991.

VIEIRA, W. H. B. *et al.* Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Rev bras fisioter.** v.10, n.2, p.205-11, 2006.

VINCK, E. M. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and power laser irradiation. **Lasers Med Sci.** v.18, n.2, p.95-9, 2003.

VLADIMIROV, Y. A. OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry.** v.69, n.1, p.81-90, 2004.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **J Photochem Photobiol B**. v.70, n.1, p.39-44, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight** – Global strategy on diet, physical activity and health, 2003. Disponível em: www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity. Acesso em 07.ago.2006.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J Clin Laser Med Surg**. v.16, n.3, p.159-165, 1998.

WILLIAMSON, J. R. Adipose tissue: morphological changes associated with lipid mobilization. **J cell Biol**. v.20, n.1, p.57-74, 1964.

WOLF, G. The mechanism and regulation of fat mobilization from adipose tissue: desnutrin, a newly discovered lipolytic enzyme. **Nutr Rev**. v.63, n.5, p.166-170, 2005.

YAMAGUCHI, T.; OMATSU, N.; OMUKAE, A. Analysis of interaction partners for perilipin and ADRP on lipid droplets. **Mol Cell Biochem**. v.167, n.1-2, p.167-73, 2006.

YU, W.; NAIM, O. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**. v.20, n.1, p.56-36, 1997.

YUEH-SHUANG, L. *et al.* Effects of Helium-Neon Laser on Levels of Stress Protein and Arthritic Histopathology in Experimental Osteoarthritis. **American journal of physical medicine e rehabilitation**. v.83, n.10, p.758-65, 2004.

ZHANG, Y. Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**. v.372, n.1, p.425-432, 1994.

APÉNDICE

APÊNDICE 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 29 de agosto de 2006.

PARECER N. 33/06/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em reunião realizada no dia 14 de agosto do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Efeitos do laser de baixa potência no tecido adiposo: um estudo experimental em ratos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 159.

O experimento classificado como de categoria A será realizado com o número de 72 Ratos *Nevergicus Albinus*, os quais após o experimento serão sacrificados.

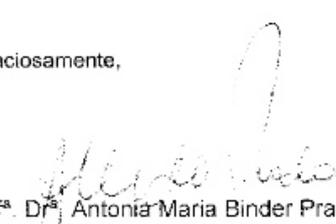
O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

- N° de animais: folha de rosto = 72 resumo 60 (adequar) e pág 29 (metodologia = 60)
- Metodologia pág 31 Eutanásia p/ via intra-cardíaco; justificar.
- Cronograma: estudo piloto em agosto? (adequar cronograma).

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,


Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Binder Prado

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilma Sra

Halina Camargo Senhorinho

APÊNDICE 2

PROTOCOLO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

1. Fixação: Glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 4%, CaCl_2 a 1 mM, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2, por 2 horas, em temperatura ambiente;
2. Lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, por 3 vezes, durante 10 minutos cada;
3. Pós-fixação: Tetróxido de Ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8%, CaCl a 1 mM, em tampão cacodilado de sódio a 0,1 M, por 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente;
4. Lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, por 3 vezes, durante 10 minutos cada;
5. Desidratação: acetona 50%, 70%, 90% e 100%, durante 15 minutos cada.
6. Infiltração: mistura I - acetona/epon 3:1 – overday, mistura II - acetona/epon 1:1 – overnight, mistura III - acetona/epon 1:3 - overday;
7. Infiltração em epon puro – overnight;
8. Polimerização em estufa à 60° C, durante 4 dias;
9. Ultramicrotomia;
10. Contrastação com citrato de chumbro e acetato de uranila;
11. Observação: microscópio eletrônico de transmissão.