

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ANTONIO EDUARDO DE AQUINO JUNIOR

**“EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (830nm)
ASSOCIADO AO EXERCÍCIO EM RATOS OBESOS
EXÓGENOS”.**

SÃO CARLOS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANTONIO EDUARDO DE AQUINO JUNIOR

**“EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE (830nm)
ASSOCIADO AO EXERCÍCIO EM RATOS OBESOS
EXÓGENOS”.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

SÃO CARLOS

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A657eL

Aquino Junior, Antonio Eduardo de.

Efeito do laser de baixa intensidade (830nm) associado ao exercício em ratos obesos exógenos / Antonio Eduardo de Aquino Junior. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Fototerapia. 3. Obesidade. 4. Exercícios físicos. 5. Adipócitos. 6. Perfil lipídico. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Antônio Eduardo de Aquino Júnior

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 29/06/2012

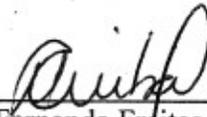
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (Orientador)
(USP)



Profa. Dra. Ana Raimunda Dâmaso (UNIFESP)



Profª. Drª. Fernanda Freitas Aníbal (UFSCar)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio Eduardo de Aquino e Silvia Helena Urbancic de Aquino, à minha irmã Heloisa de Aquino e à minha avó Hilda Ferreira Urbancic,

Que sempre acreditaram que em mim, mesmo nos momentos mais difíceis e turbulentos, sendo sempre a luz que norteia a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto** e **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato**, pela honra de ser orientando de dois grandes profissionais, por terem a confiança necessária para permitir o meu desenvolvimento profissional e por poder compartilhar tanto a sua sabedoria como a sua visão inovadora.

À minha parceira e amiga, **Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte**, por acreditar em mim, empenhar-se em me ajudar e participar das minhas principais conquistas.

À minha parceira, **Prof^a. Dr^a. Selma Maria Michelin Matheus**, por todo o empenho profissional na análise morfológica em microscopia de transmissão.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Moraes**, pela orientação na área bioquímica, pelo tratamento singular, por ter compartilhado sua sabedoria e experiência que, com certeza, serão diferenciais tanto profissionalmente como na vida.

Ao **Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira**, pelo voto de confiança que depositou em mim, sem mesmo me conhecer.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar**, a todos os professores que contribuíram para minha formação, aos meus colegas alunos do Programa e à Cláudia Pastega, por estarem presentes nesse momento importante.

Aos colegas do **Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos**, por compartilhar sua experiência e conhecimento, em especial à minha amiga **Dr^a. Fernanda Rossi Paolillo**.

Às minhas parceiras e amigas **Dr^a. Marcela Sene-Fiorese** e à **Dr^a. Fernanda Oliveira Duarte**, por sempre estarem à disposição e compartilharem de sua amizade e conhecimento.

Aos meus companheiros do **Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicado ao Exercício da UFSCar**, por todo auxílio, por todo tempo compartilhado ao lado de vocês e pelo aprendizado diário que consegui com cada um.

Aos colegas doutorandos **Fernanda Dias Moraes** e **Fernando Fabrizzi**, orientados do professor Dr. Gilberto Moraes, pela parceria, pelo aprendizado nas análises bioquímicas e pelas intermináveis horas de bancada ao qual estiveram sempre presentes e incansáveis.

Ao colega **Anderson Diogo Souza Lino** pelo auxílio nas análises bioquímicas.

Ao colega **Ms. Jorge Carmargo Oishi** por todo apoio estatístico delegado a este trabalho.

E principalmente à minha família, ao meu pai **Antonio Eduardo de Aquino**, à minha mãe **Silvia Helena Urbancic de Aquino**, à minha irmã **Heloisa de Aquino**, que a todo o momento me amparam, me fortalecem que estão juntos nos momentos mais difíceis e também nos momentos a serem comemorados.

Finalmente, à minha avó, **Hilda Ferreira Urbancic**, por ter feito parte da minha vida.

“É preciso coragem para crescer e tornar-se o que você realmente é”

“Edward Estlin Cummings”

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial que possui origem endógena e exógena e esta compreende 95% do total de casos. Um dos tratamentos leva em conta o balanço energético negativo, que é a relação entre diminuição do consumo e aumento do gasto calórico. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos sistêmicos do laser de baixa intensidade associado ao exercício moderado de natação em animais obesos exógenos.

Foram utilizados 64 animais divididos em 8 grupos. Foi induzida obesidade por meio de dieta hipercalórica três semanas antes do início do projeto. Os grupos foram descritos como: SP (sedentário padrão), SNL (sedentário padrão laser), EP (exercitado padrão), EPL (exercitado padrão laser), SH (sedentário hipercalórico), SHL (sedentário hipercalórico laser), EH (exercitado hipercalórico) e EHL (exercitado hipercalórico laser). O protocolo de exercício seguiu parâmetros de Dâmaso, 1996. O parâmetro de irradiação foi de 100mW, 60mW/cm², tempo de tratamento de 47s e aplicado nas duas patas traseiras dos animais logo após o exercício.

A associação entre fototerapia e exercício de intensidade moderada em relação à situação de obesidade experimental pela dieta foi capaz de promover a reversão de quadros de aumento celular, diminuição dos valores lipídicos séricos, tendo influência positiva quanto à diminuição do delta da massa corporal.

O surgimento de novas possibilidades no tratamento da obesidade e de doenças associadas a ela, como por exemplo, as dislipidemias, são imprescindíveis mediante o padrão de comportamento alimentar que a sociedade atual se dispõe a utilizar. Assim, a possibilidade de um modelo clínico torna-se interessante mediante adequação da tecnologia empregada no experimento, para a prática clínica multidisciplinar.

Palavras chave: obesidade, exercício, perfil lipídico, laser de baixa intensidade.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease that has endogenous and exogenous origin and this includes 95% of all cases. One of the treatments takes into account the negative energy balance, which is the relationship between decreasing consumption and increased caloric expenditure. The aim of this study was to evaluate the systemic effects of low intensity laser associated the moderate exercise of swimming in obesity animals exogenous.

Male Wistar rats were randomly distributed in eight groups (N=64). **SC** (sedentary chow-diet) **SCL** (sedentary chow-diet laser), **EC** (exercised chow-diet), **ECL** (exercised chow-diet laser), **SH** (sedentary high-fat diet), **SHL** (sedentary high-fat diet laser), **EH** (exercised high-fat diet) and **EHL** (exercised high-fat diet laser).

The exercise protocol followed parameters of Damaso, 1996. The irradiation parameters was 100mW, 60mW/cm², and the Treatment time was 47s applied to both hind feet of the animals immediately after the exercise.

Significant differences were found in groups with association between laser and exercise, in special the biochemical parameters (total cholesterol, triglycerides and LDL) as well as modification of the adipocytes area by morphometric analysis.

The advent of new possibilities in the treatment of obesity and associated diseases such as dyslipidemia is crucial upon the pattern of eating behavior that modern society is willing to use. The therapy show to be a possible additional tool in treatment of obesity.

Key words: obesity, exercise, lipid profile, low-level laser therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – ácido desoxirribonucleico

TAB – tecido adiposo branco

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

IL-6 – interleucina 6

IL-1 β – interleucina 1 beta

MCP-1 – proteína quimiotática 1 de monócitos

PAI – 1 – inibidor 1 do ativador do plasminogênio

LPL – lipase lipoprotéica

TGF β – fator beta de transformação do crescimento

IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile

FC – frequência cardíaca

Vo₂ máx – ventilação de oxigênio máximo

Fc Max – frequência cardíaca máxima

METS – múltiplo de taxa metabólica de repouso

LASER – light amplification by stimulated emission of radiation

μ m – micrômetro

EPI – tecido adiposo branco epididimal

RET – tecido adiposo branco retroperitoneal

VIS – tecido adiposo branco visceral

SP – grupo sedentário padrão

SPL – grupo sedentário padrão laser

SH – grupo sedentário hipercalórico

SHL – grupo sedentário hipercalórico laser

EP – grupo exercitado padrão

EPL – grupo exercitado padrão laser

EH – grupo exercitado hipercalórico

EHL – grupo exercitado hipercalórico laser

Ga-Al-As - Gallium-Aluminum-Arsenide

RPM – rotações por minuto

Mmoles – milimoles

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo Alimentar	34
Tabela 2. Valores totais de calorias ingeridas por gramas de dieta consumida ao longo de todo período experimental.	35
Tabela 3. Peso relativo dos tecidos (g/100g PC).	36
Tabela 4. Peso relativo dos tecidos adiposos (g/100g PC).	37
Tabela 5. Glicogênio muscular e hepático.	38
Tabela 6. Percentual de gordura de tecidos.	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Delta de massa corporal de animais alimentados com dieta padrão	32
Gráfico 2. Delta de massa corporal de animais alimentados com dieta cafeteria.	32
Gráfico 3. Delta de massa corporal entre animais que receberam tratamento de laser	33
Gráfico 4. Percentual de gordura do fígado.	39
Gráfico 5. Colesterol total.	41
Gráfico 6. Triglicerídeos.	42
Gráfico 7. Lipoproteína de baixa densidade.	43
Gráfico 8. Lipoproteína de alta densidade.	44
Gráfico 9. Tecido adiposo branco epididimal.	45
Gráfico 10. Tecido adiposo branco retroperitoneal.	46
Gráfico 11. Tecido adiposo branco visceral.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da obesidade no mundo.	14
Figura 2. Adipócito do tecido adiposo branco epididimal (esquerda) e tecido adiposo branco visceral (direita).	17
Figura 3. Penetração mediante diferentes comprimentos de onda (Barolet, 2008)...	21
Figura 4. Modelo experimental.	24
Figura 5. Laser de baixa intensidade (esquerda) e área preparada por meio de tricotomia.....	27
Figura 6. Quadro de comparações e alterações positivas e negativas.	48
Figura 7. Quadro de efeito do laser quando associado à dieta normocalórica.....	52
Figura 8. Quadro de efeito do laser quando associado a dieta hipercalórica.....	53
Figura 9. Quadro de efeito do laser quando associado ao exercício na presença de dieta normocalórica.	58
Figura 10. Quadro de efeito do laser quando associado ao exercício na presença de dieta hipercalórica..	59

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 BIOTECNOLOGIA	13
1.2 OBESIDADE	14
1.3 TECIDO ADIPOSEO.....	15
1.4 ADIPÓCITOS	16
1.5 ABSORÇÃO, TRANSPORTE E CAPTAÇÃO	17
1.6 ALIMENTAÇÃO E FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO	18
1.7 LASER DE BAIXA INTENSIDADE	20
1.8 INTERAÇÃO DO LASER COM MECANISMOS BIOLÓGICOS	20
1.9 LASER E EXERCÍCIO	22
1.10 JUSTIFICATIVA.....	22
2. OBJETIVOS	22
2.1. GERAL	22
2.2. ESPECÍFICOS.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. APROVAÇÃO	24
3.2. ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	24
3.3. MODELO EXPERIMENTAL	24
3.4. COMPOSIÇÃO DA DIETA PADRÃO OU NORMOCALÓRICA E DA DIETA CAFETERIA OU HIPERCALÓRICA	26
3.5. PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO.....	26
3.6. PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	27
3.7. CONTROLE DA MASSA CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR	27
3.8. COLETA DE AMOSTRAS.....	28
3.9. PESO RELATIVO DOS TECIDOS	28
3.10. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICA.....	28
3.10.1. Medida de área dos Adipócitos.....	28
3.10.2. Glicogênio Muscular e Hepático.....	29
3.10.3. Percentual de Gordura.....	30
3.10.4. Análises Bioquímicas do Soro.....	30
3.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	31
4. RESULTADOS	32
4.1. DELTA DA MASSA CORPORAL	32
4.2. CONSUMO ALIMENTAR	34
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE KCAL.....	35
4.4. PESO RELATIVO DOS TECIDOS	36
4.5. ANÁLISE DE GLICOGÊNIO	38
4.6. PERCENTUAL DE GORDURA DOS TECIDOS	39
4.7. ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO	41
4.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO	45
5. DISCUSSÃO	48
5.1. EFEITO DA DIETA	49
5.2. EFEITO DO LASER ASSOCIADO A DIFERENTES DIETAS	50

5.3.EFEITO DO EXERCÍCIO.....	52
5.4.EFEITO DO LASER ASSOCIADO AO EXERCÍCIO.....	55
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO 1.....	66
ANEXO 2.....	66
ANEXO 3.....	67
ANEXO 4.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOTECNOLOGIA

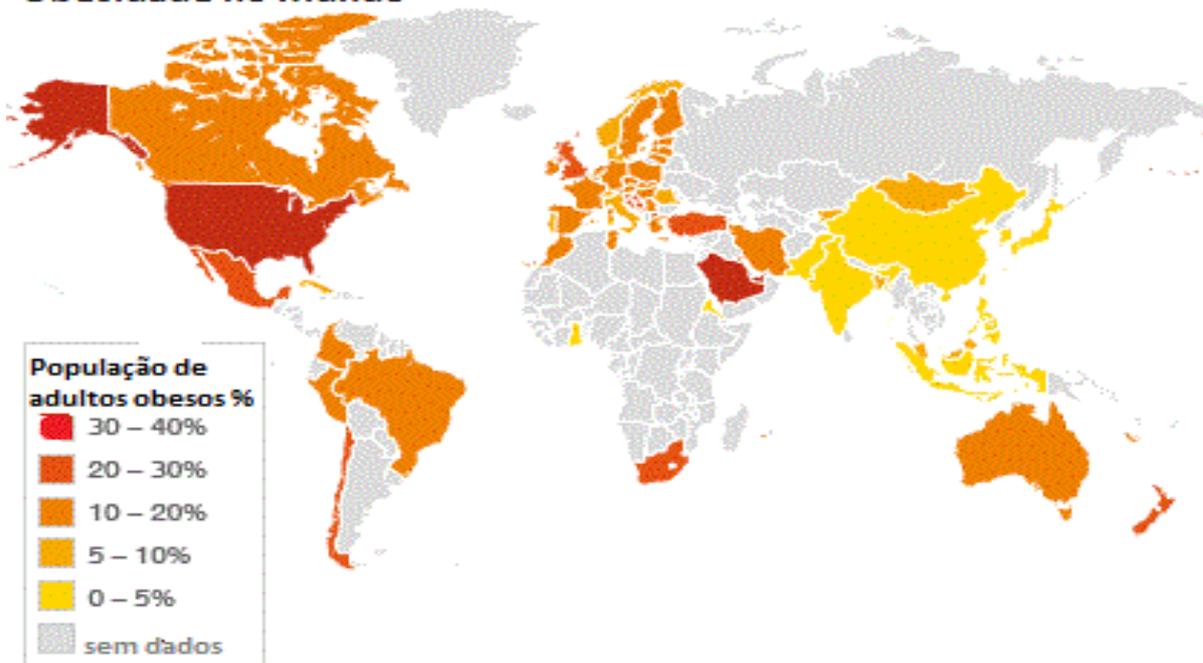
A Biotecnologia como área multidisciplinar que envolve diversas áreas de conhecimento, entre elas a engenharia, a física, a química, a biologia e a medicina, responsáveis pelo desenvolvimento de produtos ou processos. Um exemplo de desenvolvimento e aperfeiçoamento com o uso dos conhecimentos da biotecnologia é a insulina, hormônio responsável pela manutenção dos níveis glicêmicos plasmáticos.

Assim, juntamente com o avanço da medicina e da tecnologia ocorreu também o aumento da expectativa de vida, eliminando ou diminuindo fatores que antes eram considerados como grandes causadores de óbito (Buckwalter, 2000; Paollilo, 2011a).

Desta forma, mediante produtos, processos e inúmeras novas possibilidades, o aumento da longevidade e da qualidade de vida são pontos importantes que além de sempre perseguidos pela humanidade, também são objetivos desta nova e abrangente área científica e tecnológica.

Ao mesmo tempo em que é conquistada a melhora da qualidade de vida, todos os avanços da vida contemporânea e as facilidades existentes transformaram a obesidade em um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (figura 1), agregando inúmeras doenças que provocam a diminuição da qualidade de vida e consequente aumento da mortalidade.

Obesidade no Mundo



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2005.

Figura 1. Distribuição da obesidade no mundo.

1.2 OBESIDADE

O alarmante crescimento da obesidade é motivo de preocupação global, qualificada como a epidemia do novo século. Essa doença é um dos grandes males da sociedade contemporânea, determinada como uma enfermidade multifatorial, onde 95% dos casos são classificados como de origem exógena, ou seja, fatores de causa externa, como alimentação inadequada e inatividade física (Dâmaso, 2003). A classificação exógena indica que a ingestão calórica excessiva em detrimento da diminuição da atividade física diária é a causa de tantos casos de obesidade, que é crescente também em crianças (Dâmaso, 2003; Lombard et al., 2009).

Quando de origem endógena, a obesidade é advinda de fatores intrínsecos ao corpo, como alterações genéticas ou hormonais, que podem alterar o metabolismo do indivíduo a ponto de resultar em alguns tipos de doenças, as quais possuem caráter crônico degenerativo como dislipidemias, hipertensão, cardiopatias, diabetes *mellitus* tipo II, asma e alterações na mecânica da marcha, dentre outras. (Aquino Jr et al., 2008; Finucane, 2009; Seidell, 2000; Nathan & Moran, 2008).

Um dos tratamentos da obesidade considera o balanço energético negativo, que é estabelecido através da diminuição da ingestão calórica e aumento do gasto energético associado à atividade física. Assim, ocorre uma diminuição da massa adiposa e, conseqüentemente, melhora na saúde geral, proporcionando o aumento na qualidade de vida do indivíduo (Dâmaso, 2003).

Desta forma, até hoje, o exercício físico e a alimentação equilibrada representam a principal forma de intervenção, visando o controle de peso e alterações metabólicas decorrentes da obesidade.

1.3 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo possui múltiplos depósitos, ou seja, é encontrado em várias regiões dentro do organismo e, por isso, não possui forma definida. Este tecido distribui-se difusamente por diversas regiões, como a região subcutânea, sob a extensão da pele ou regiões mais profundas, conectando-se à vísceras e músculos (De Castro, 2009).

Durante décadas, o tecido adiposo foi considerado o principal órgão de deposição de energia, sendo ainda considerado um sítio corporal inerte, no entanto, não mais é desta forma. Entretanto, esse conceito está sendo modificado ao longo dos anos devido ao grande número de pesquisas realizadas sobre esse tecido (Trayhurn et al., 2006; Rodriguez et al, 2007; Clement & Langin, 2007), sendo considerado um órgão endócrino. Entre as razões dessa mudança conceitual está o fato do tecido adiposo branco (TAB) ser sítio primário de produção hormonal envolvido diretamente no balanço energético, como a leptina e a adiponectina, além de marcadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e seus receptores solúveis, a interleucina-1Beta (IL-1 β), a proteína quimiotática 1 de monócitos (MCP-1) e o inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), proteínas de transporte como a lipase de lipoproteínas (LPL), a apolipoproteína E, fatores de crescimento como o fator Beta de transformação do crescimento (TGF- β) e o fator de crescimento insulina-símile (IGF-1), entre outros (Sene-Fiorese et al., 2008; Duarte et al., 2008; De Campos, 2001), além dos marcadores anti-inflamatórios, como IL-4 e IL-10.

No entanto, as funções primárias do tecido adiposo branco são de regulação dos processos de síntese e oxidação dos lipídios, favorecendo, desse modo, a manutenção do balanço energético (Cinti, 2001; Trayhurn et al., 2006). Embora haja essa função primária, a obesidade é compreendida como aumento da massa do tecido adiposo, tanto na região central e visceral quanto na periférica, que pode ser resultado do desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético. Quando a ingestão de alimentos excede o gasto energético pode ocorrer o aumento no tamanho e por consequência após um processo mais demorado, no número de células adiposas, um processo distinto que compreende o recrutamento de pré-adipócitos e amadurecimento dos mesmos.

1.4 ADIPÓCITOS

O crescimento do tecido adiposo envolve tanto o processo de hipertrofia (aumento do volume das células adiposas) quanto o de hiperplasia (aumento do número das células adiposas). A hipertrofia ocorre devido ao excesso de acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos, enquanto a hiperplasia é resultante do recrutamento de pré-adipócitos. A hipertrofia precede a hiperplasia. A capacidade dos dois processos pode variar de acordo com a região de depósito em questão (De Castro, 2009).

Seu citoplasma possui como característica fundamental a presença de um vacúolo lipídico único que ocupa a porção central da célula, posicionando as demais organelas para a periferia. O vacúolo gorduroso soma aproximadamente 90% da massa celular (De Castro, 2009). Em estudo abordado por McArdle (2003), a massa corporal de obesos mostra-se, em média, mais que o dobro daquela dos não-obesos, além de possuírem quase três vezes mais gordura corporal. Em termos de quantidade de células, os adipócitos nas pessoas obesas mostraram-se em média 50% maiores, com quase três vezes mais do que o normal.

Assim, o número de células e seu tamanho representam a principal diferença estrutural na massa do tecido adiposo dos indivíduos obesos. Em ratos, o número e o tamanho das células aumentam durante a 6ª e a 15ª semanas de vida, sendo que aumentos subsequentes ocorrem de forma exclusiva pelo aumento do tamanho das células e não pelo surgimento de novas estruturas (McArdle, 2003).

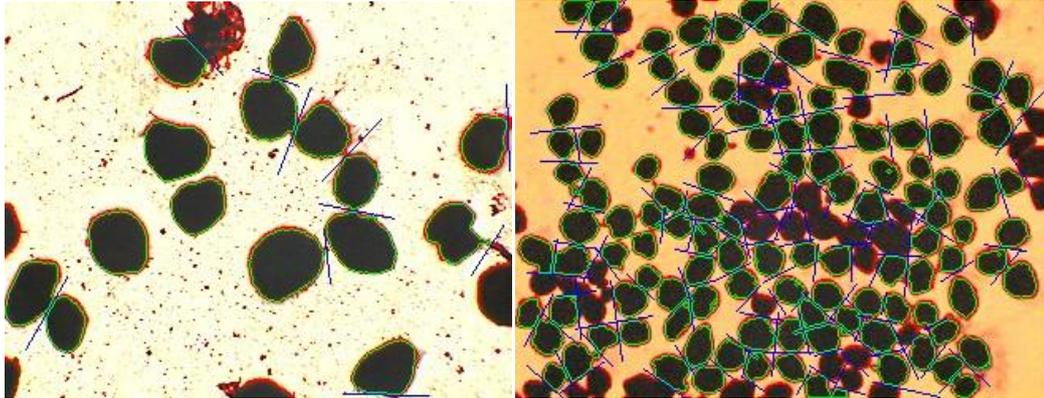


Figura 2. Adipócito do tecido adiposo branco epididimal (esquerda) e tecido adiposo branco visceral (direita).

1.5 ABSORÇÃO, TRANSPORTE E CAPTAÇÃO

Os processos de absorção, de transporte e de captação de produtos provenientes dos lipídios são de extrema importância, uma vez que os lipídios oriundos da dieta são em grande maioria triglicerídeos, compostos basicamente de três ácidos graxos esterificados ao glicerol. Esta integridade não possibilita a sua absorção imediata, sendo necessária a sua hidrólise.

A absorção dos produtos da digestão lipídica no lúmen intestinal é um processo importante e garantido pela solubilização micelar. A hipótese de absorção baseia-se na concentração de sais biliares no lúmen intestinal que, quando excedem a concentração micelar crítica, formam micelas mistas, desenvolvidas por sais biliares e fosfolipídios que incorporam os produtos da digestão lipídica (Curi, 2002).

O transporte dos lipídios no organismo pode ser descrito por duas vias metabólicas distintas, a exógena e a endógena. A via metabólica exógena representa o transporte dos lipídios da dieta, do intestino para o fígado. Nesta via, ocorre a hidrólise dos ácidos graxos da dieta, que em sua maioria se encontram sob a forma de ésteres de colesterol, fosfolipídios e triglicerídeos por intermédio das lipases pancreática e intestinal.

Assim, os ácidos graxos participam da formação das micelas (absorção), juntamente com os fosfolipídios, ácidos e sais biliares, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e colesterol livre. Diferentemente, a via metabólica endógena proporciona o transporte das lipoproteínas sintetizadas nos hepatócitos, do fígado para os tecidos periféricos (Curi, 2002).

O transporte de ácidos graxos, seja na forma livre ou esterificada, é realizado por lipoproteínas, albumina e outras proteínas transportadoras. A forma livre é originária dos adipócitos e transportada no plasma por meio da albumina. A forma esterificada possui origem no fígado e é transportada pelas VLDL (proteínas de densidade muito baixas) e, em proporção menor, pelas LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade).

Basicamente, as moléculas VLDL são formadas no fígado e fundamentais no transporte dos ácidos graxos sob a forma de triglicerídeo; as moléculas de LDL são responsáveis pela distribuição do colesterol nos tecidos externos ao fígado; Contrariamente, as moléculas de HDL realizam função fundamental no transporte reverso do colesterol, removendo o excesso dos tecidos periféricos e transportando para o fígado, onde é metabolizado (Curi, 2002).

A captação de ácidos graxos circulantes, advindos do tecido adiposo para utilização muscular, é dependente da taxa de lipólise, da capacidade de transporte dos ácidos graxos no plasma e da reesterificação desses pelos adipócitos (Curi et al., 2003). A utilização deste substrato no exercício mostra-se favorecida, principalmente em exercícios aeróbios, mediante aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo (Curi et al., 2003).

1.6 ALIMENTAÇÃO E FISIOLOGIA DO EXERCÍCIO

A obesidade, definida como acúmulo excessivo de gordura corporal, é um distúrbio heterogêneo com uma via comum final, na qual a ingestão energética ultrapassa cronicamente o dispêndio de energia (McArdle, 2003). A alimentação desregrada, presente nos dias de hoje, aliada aos alimentos com baixo valor nutricional e altamente energético, são fatores que fortalecem o aumento dos números epidêmicos desta doença.

Os estilos de vida fisicamente ativos reduzem o padrão normal de aumento de gordura na vida adulta. Para homens jovens e de meia-idade que realizam atividade física regularmente, o tempo gasto na atividade física relaciona-se inversamente com o nível de gordura corporal (McArdle, 2003). Assim, são observados efeitos benéficos do exercício realizado continuamente (5 vezes/semana), principalmente, na prevenção e tratamento de doenças crônicas (Cheik, 2002; Sene-Fiorese et al., 2008).

A redução de peso, obtida unicamente através de dieta (Cheik, 2002), resulta apenas na perda de água e proteínas, embora haja constatação de perda de massa magra mediante restrição moderada (Duarte et al., 2008). Contrariamente, a utilização de exercícios para a perda de peso possibilita o aumento da massa muscular (hipertrofia muscular induzida principalmente por exercícios resistidos). Neste sentido, os exercícios de natureza contínua, que se associam a uma taxa de gasto energético, variando entre moderada e elevada, são as mais recomendadas (Cheik, 2002).

Assim, exercícios de intensidade leve e moderada e de longa duração promovem o aumento progressivo da utilização de ácidos graxos livres como substrato energético preferencial, devido a capacidade de oxidação, observando-se a continuidade deste processo durante as primeiras horas de recuperação após a atividade (Sene-Fiorese, 2008). Desta forma, para obesos, cujo objetivo é perder peso, a recomendação para o controle da obesidade perfaz o tempo de 60 a 90 minutos de atividade física moderada por dia (Dâmaso, 2003; Whitehead, 2002).

Com relação à intensidade, a forma moderada pode ser definida clinicamente como aquela realizada de tal maneira que permita manter conversação entre os praticantes do exercício. Em termos fisiológicos é aquela intensidade em que a Frequência Cardíaca (FC) permanece entre 55 a 72% do Volume de Oxigênio máximo (VO₂ máx.) ou entre 60-79% da Frequência Cardíaca máxima (FC máx.), que metabolicamente corresponderia a algo entre 3-6 METS (múltiplo de taxa metabólica de repouso) (McArdle, 2003; Dâmaso, 2009).

Portanto, a intensidade do exercício determina a via metabólica e o substrato energético que será usado como fonte de energia (Hernández-Torres et al., 2007). Quando a intensidade do exercício é controlada, o gasto energético é o principal fator que influencia as modificações substanciais no metabolismo dos lipídios e das lipoproteínas (Dâmaso, 2009).

1.7 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O termo LASER é a abreviatura do inglês: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa “Ampliação da Luz por Emissão de Radiação”, sendo este o princípio base da sua criação. A luz emitida é obtida a partir de um mecanismo especial, no qual um meio ativo com átomos no estado fundamental tornam-se excitados na presença, como por exemplo, de descarga elétrica. A emissão espontânea de um fóton por um desses átomos adiciona mais luz à porção já existente. Esses fótons se refletem nos espelhos da cavidade, voltando para a amostra e provocando mais emissão estimulada e uma porção dessa luz emerge do sistema, constituindo o feixe da luz laser. Dependendo do meio ativo serão obtidos diferentes comprimentos de onda, na região do espectro visível e invisível (Bagnato, 2008a; Bagnato, 2008b).

Os lasers utilizados para fototerapia encontram-se na região do espectro entre o visível e infravermelho (700nm e 1150nm). Uma vantagem da aplicação da radiação infravermelha, quando comparada com a radiação visível, é a sua maior penetração nos tecidos (figura 4), tendo em vista que é pouco absorvível pela mielina e pela hemoglobina presentes na superfície tecidual (Vieira, 2004; Svanberg, 2002).

1.8 INTERAÇÃO DO LASER COM MECANISMOS BIOLÓGICOS

Embora muitos estudos devam ser realizados para melhor esclarecer os mecanismos de ação do laser, acredita-se que esse tipo de radiação possui a capacidade de alterar o metabolismo celular, ou seja, estimular ou inibir atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas, na ausência de aquecimento tecidual significativo. Esse fenômeno, que se denomina biomodulação, acontece quando ocorre absorção dos fótons pelos fotoceptores ou biomoléculas presentes na mitocôndria e na membrana celular. Entretanto, os efeitos terapêuticos são dependentes dos parâmetros de irradiação, como o comprimento de onda, densidade de potência, energia e dose, além da frequência de tratamento (Vieira, 2004).

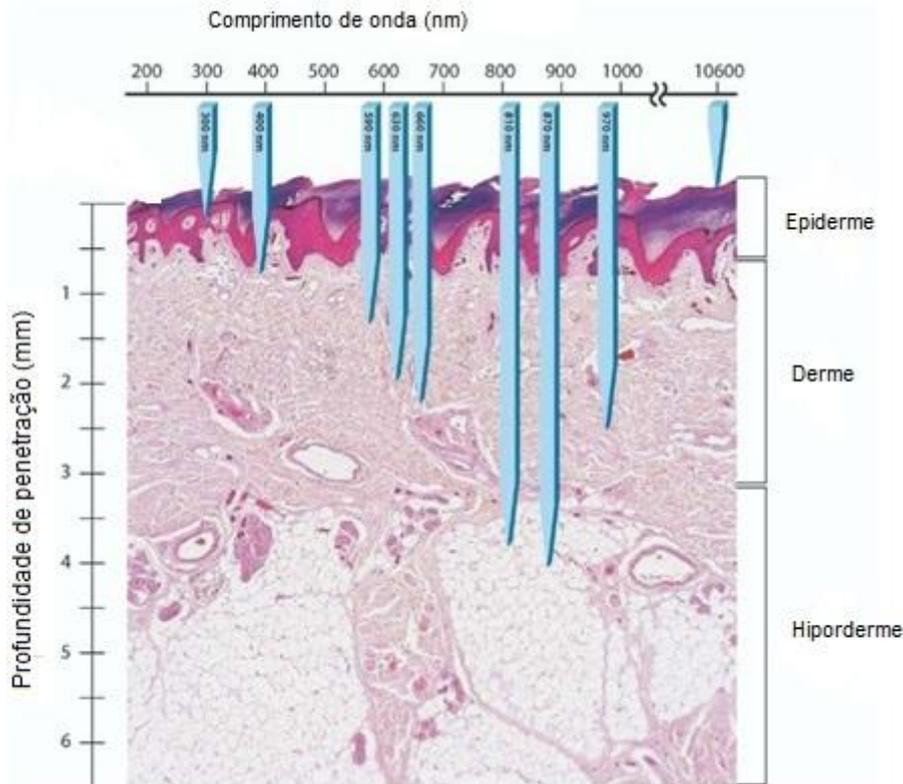


Figura 3. Penetração mediante diferentes comprimentos de onda (Barolet, 2008).

Dentre inúmeros eventos que ocorrem, podem ser destacadas: mudanças físicas e químicas nas membranas mitocondriais e no tamanho de suas estruturas; mudança nas propriedades redox dos carreadores de energia com a consequente aceleração no transporte de elétrons da cadeia respiratória; aumento transitório local na temperatura dos cromóforos; geração de espécies reativas de oxigênio; e geração de oxigênio molecular pela ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória de elétrons (Vieira, 2004; Bakeeva et al., 1993).

1.9 LASER E EXERCÍCIO

A fototerapia associada ao exercício físico é fundamental, pois ao executar um treinamento ou uma sequência de exercícios físicos, o organismo é submetido a um estresse metabólico, cardiovascular, respiratório, muscular e ósseo, que resulta em quebra da homeostase e exige do corpo adaptações a esse estresse ou ao desequilíbrio momentâneo causado pela atividade física. Neste momento, a aplicação da fototerapia é essencial para interagir com as respostas fisiológicas ao exercício físico (Paolillo et al. 2012).

Ainda, a luz age no metabolismo energético celular através de mecanismos químicos com ativação ou mudança do potencial redox na cadeia respiratória da mitocôndria, bem como através de mecanismos estruturais que possibilitam a formação de mitocôndrias gigantes (Bakeeva et al. 1993). Considerando que o exercício também é fator de alterações estruturais e metabólicas na mitocôndria (Paolillo, 2011b), a fototerapia pode ser associada ao exercício como meio de potencializar a utilização das vias metabólicas e o condicionamento físico com consequente melhora na saúde geral.

1.10 JUSTIFICATIVA

Em meio a uma crescente dos casos de obesidade e sobrepeso que alcançaram níveis epidêmicos, a associação de tecnologias, por exemplo, o laser, que pode proporcionar um estímulo a mais no tratamento desta doença, em especial quando associado ao exercício, torna-se fundamental como nova possibilidade de mecanismo assessor e não invasivo.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos sistêmicos do treinamento crônico de natação em intensidade moderada quando associado à ação do laser de baixa intensidade (830nm) em animais obesos exógenos.

2.2.ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos do exercício moderado associado ao laser de baixa intensidade em animais obesos exógenos sobre os parâmetros:

- Consumo alimentar;
- Eficiência alimentar;
- Ganho de massa corporal - Delta;
- Quantidade de calorias ingeridas ao longo do período experimental;
- Percentual de gordura dos tecidos adiposos brancos epididimal (EPI), retroperitoneal (RET), e visceral (VIS), além de tecido adiposo marrom (TAM).
- Percentual de gordura do tecido muscular gastrocnêmio (GAST) e do fígado (FIG);
- Concentração plasmática de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e LDL-colesterol;
- Concentração de glicogênio muscular (músculo gastrocnêmio e sóleo) e hepático;
- Análise Morfométrica do tecido adiposo branco (microscopia óptica), possibilitando mensurar a área dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos: epididimal (EPI) retroperitoneal (RET), e visceral (VIS);

2.3.HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a associação entre o exercício moderado e o laser de baixa intensidade possam promover alterações metabólicas e estruturais na mitocôndria, que sejam capazes de interferir positivamente no perfil lipídico e quanto ao acúmulo de gordura, permitindo a possibilidade de um novo tratamento para obesidade e dislipidemias, melhorando a qualidade de vida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.APROVAÇÃO

Este projeto foi encaminhado ao comitê de ética para experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos e obteve aprovação mediante registro 067/2010.

3.2.ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados 64 ratos machos adultos, com aproximadamente 90 dias, sendo recebidos aos 21 dias de vida para ambientação e acompanhamento durante todo o protocolo experimental, pertencendo a Linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, do Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, da Universidade Federal de São Carlos, em gaiolas individuais, com temperatura constante de aproximadamente 24° C e fotoperíodo artificial de 12/12 horas, com fornecimento de dieta e água *ad libitum*.

Os grupos dieta hipercalórica receberam a devida alimentação previamente por 3 semanas antes do início do experimento, o qual segundo Duarte (2011) proporciona a ocorrência do quadro de obesidade.

3.3.MODELO EXPERIMENTAL

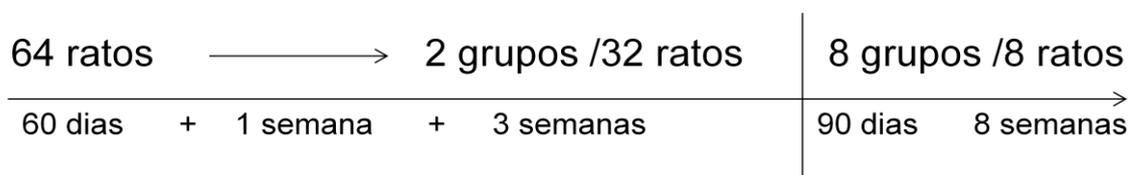


Figura 4. Modelo experimental.

Os animais com 60 dias de vida foram subdivididos em:

1)Grupo Sedentário Normocalórico – (SP): animais mantidos sedentários, com adaptação ao biotério por 3 semanas e alimentados com dieta padrão, durante todo o período experimental.

2)Grupo Sedentário Hipercalórico – (SH): animais mantidos sedentários, com adaptação ao biotério e induzidos à obesidade por 3 semanas e alimentados com dieta hipercalórica durante todo o período experimental.

3)Grupo Sedentário Normocalórico Laser – (SPL): animais mantidos sedentários, com adaptação ao biotério por 3 semanas e alimentados com dieta padrão, durante todo o período experimental. Tratados com laser 1 vez ao dia, 5 vezes por semana.

4)Grupo Sedentário Hipercalórico Laser – (SHL): animais mantidos sedentários, com adaptação ao biotério e induzidos à obesidade por 3 semanas e alimentados com dieta hipercalórica durante todo o período experimental. Tratados com laser 1 vez ao dia, 5 vezes por semana.

5)Grupo Exercitado Normocalórico – (EP): animais mantidos sedentários durante a adaptação ao biotério por 3 semanas. Adaptados ao treinamento por 1 semana e treinados 5 vezes por semana, durante 7 semanas, alimentados com dieta padrão, durante todo o período experimental.

6)Grupo Exercitado Hipercalórico – (EH): animais mantidos sedentários durante a adaptação ao biotério e induzidos à obesidade por 3 semanas. Adaptados ao treinamento por 1 semana e treinados 5 vezes por semana, durante 7 semanas, alimentados com dieta hipercalórico, durante todo o período experimental.

7)Grupo Exercitado Normocalórico Laser – (EPL): animais mantidos sedentários durante a adaptação ao biotério por 3 semanas. Adaptados ao treinamento por 1 semana e treinados 5 vezes por semana, durante 7 semanas, alimentados com dieta padrão, durante todo o período experimental. Tratados com laser 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, logo após o treinamento.

8)Grupo Exercitado Contínuo Hipercalórico Laser – (EHL): animais mantidos sedentários durante a adaptação ao biotério e induzidos à obesidade por 3 semanas. Adaptados ao treinamento por 1 semana e treinados 5 vezes por semana, durante 7 semanas, alimentados com dieta hipercalórico, durante todo o período experimental.

3.4.COMPOSIÇÃO DA DIETA PADRÃO OU NORMOCALÓRICA E DA DIETA CAFETERIA OU HIPERCALÓRICA

A dieta padrão, composta de ração balanceada da marca NUVILAB, contendo 3,78 kcal/g, sendo ofertados 40 g/dia, num total de 151,2 kcal/dia. De acordo com o fabricante, cada 100g dessa dieta contém: 4% de lipídios (Zambom et al., 2009).

A dieta cafeteria é constituída por uma mistura hipercalórica, com a seguinte proporção:

- 15g de ração balanceada da marca NUVILAB.
- 10g de amendoim torrado
- 10g de chocolate ao leite
- 5g de bolacha maizena

Esses constituintes serão moídos e misturados. O conteúdo energético da dieta de chamada “cafeteria” será de 21,40 KJ/g, perfazendo 4,37 KJ/g a mais do que a dieta padrão que será utilizada (17,03 KJ/g). Esta dieta hiperlipídica foi previamente padronizada por Estadella et al. (2004) como uma dieta capaz de desenvolver obesidade em ratos, onde cada 100g contém 20% de lipídios (Duarte et al, 2008; Zambom et al., 2009).

3.5.PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO

Os animais dos grupos exercitados foram submetidos ao exercício aeróbio moderado (natação), com duração de 90 minutos, frequência de 05 vezes por semana, durante 08 semanas, em tanques individuais (50 cm de altura x 30 cm de diâmetro), contendo água aquecida na temperatura aproximada de 32°C e trocada diariamente.

Para a adaptação ao treinamento, nos três primeiros dias os ratos resumiu-se em nadar, respectivamente, por 30, 60 e 90 minutos sem adição de carga. Do quarto dia em diante, os animais nadaram por 90 minutos, com adição de sobrecarga atada à cauda (3 a 5% do peso corpóreo), para que o animal não flutuasse e mantivesse-se em atividade durante todo o período estipulado para a realização do exercício. Este procedimento foi previamente padronizado por Dâmaso (1996).

3.6.PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O laser de baixa intensidade utilizado foi Thera Laser da marca DMC®, tipo Ga-Al-As. O Tratamento realizado teve o uso do laser infravermelho de forma diária, utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 830nm, dose de 4,7J/cm² por ponto de aplicação, potência de 100 mW, irradiância de 60 mW/cm² no modo contínuo, totalizando 9,4J de energia liberada por todo período experimental, utilizando-se a técnica pontual. As aplicações da radiação laser no grupo submetido ao exercício foram realizadas imediatamente após a natação, tendo em vista aproveitar as condições de estresse físico e as consequentes alterações metabólicas do animal, uma vez que há maior eficácia do laser nessas condições (Vieira, 2004). As aplicações foram feitas uma vez ao dia, em cada pata traseira dos animais, totalizando duas aplicações por animal/dia, sendo na região do músculo gastrocnêmio. A região de aplicação foi preparada por meio de tricotomia.



Figura 5. Laser de baixa intensidade (esquerda) e área preparada por meio de tricotomia.

3.7.CONTROLE DA MASSA CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

A massa corporal de cada animal foi mensurada diariamente durante todo o período experimental, bem como o consumo alimentar, calculada através da diferença de peso entre a ração ofertada e a rústia. Os valores obtidos para cada variável serão anotados em fichas individuais.

Para o cálculo da evolução do peso corporal será utilizada a fórmula:

$$\text{Delta} = [(\text{Peso final} - \text{peso inicial} / \text{peso inicial}) \times 100]$$

3.8.COLETA DE AMOSTRAS

Os animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados por decapitação em guilhotina ao final de 08 semanas de tratamento, sendo que este processo foi realizado 24 horas após a última sessão de exercício.

Após a decapitação, o sangue foi centrifugado e o plasma, juntamente com o dímero esquerdo do músculo gastrocnêmio foram armazenados em -80°C. A porção superior do dímero direito do músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, os tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal, e visceral ou omental, o tecido adiposo marrom inter-escapular, o fígado e o coração foram coletados, pesados e estocados em freezer a -20°C para posteriores análises bioquímicas. Para análise morfométrica dos tecidos de gordura, foram separados 100mg de cada tecido adiposo e fixados em solução tampão de colidina 0,2M, contendo tetróxido de ósmio, descrita posteriormente.

3.9.PESO RELATIVO DOS TECIDOS

O peso relativo dos tecidos foi mensurado utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{Peso do tecido} \times 100 / \text{Peso do animal}$. Unidade em percentual.

3.10.ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICA

3.10.1.MEDIDA DE ÁREA DOS ADIPÓCITOS

Após a separação dos tecidos, aproximadamente 100mg de tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e visceral, foram removidos de cada depósito de gordura e colocados em solução salina, de forma a lavar e remover as gorduras livres. Em seguida, para a determinação do tamanho das células adiposas, os tecidos foram fixados em tampão colidina 0,2 M, contendo 1% de tetróxido de ósmio, colocado em estufa a 37°C, por um período de 24 horas. As células foram lavadas e suspensas em solução salina morna e imediatamente retiradas e espalhadas em lâminas para posterior medida das áreas dos adipócitos. Este método foi previamente descrito por Hirsch & Gallian (1968).

Para a medida referente às respectivas áreas das células adiposas foi utilizado um sistema de microscopia ótica, Motic Images Advances 3.2. Para a verificação de possíveis modificações da celularidade adiposa de ratos machos, decorrentes da realização do protocolo proposto, do tipo de dieta e da ação do laser de baixa intensidade sobre ambas as variáveis, foram mensuradas 400 áreas de adipócitos dos tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal e visceral) de cada animal.

Este procedimento permite uma observação da área do adipócito, utilizando aproximadamente 2000 áreas de adipócitos por grupo de animais, por tecido, totalizando neste estudo 48.000 áreas de adipócitos mensuradas. Os valores médios e os respectivos desvios padrões foram expressos em μm^2 .

3.10.2. GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO

O conteúdo de glicogênio muscular e hepático foram quantificados após digestão alcalina de 200 mg de tecido muscular e 100 mg de tecido hepático em 1,0 ml de KOH 6N, em “banho-maria” fervente por 3 minutos. Após essa etapa, 250 μl de extrato da suspensão será transferido para 3,0 ml de Etanol (70%) e 1,0 ml de K_2SO_4 (10%). Após a flocculação, a solução será centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado será ressuspendido com água destilada (2,0 ml) e uma alíquota adequada (500 μl para músculo e 100 μl para fígado) será adicionada a 500 μl de fenol (4,1%), seguido de adição de ácido sulfúrico concentrado ao meio de reação (Dubois et al., 1956). Os tubos de reação foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em espectrofotômetro a 480 nm. A concentração de glicosil-glicose será estimada contra um padrão de glicose contendo 100 nmoles.

A concentração de glicogênio muscular e hepático foi determinada a partir da fórmula:

$$\text{Concentração Glicogênio} = \frac{\text{Abs Am.} \times [\text{padrão glicose}] \times \text{diluição}}{\text{Abs Pb.} \times \text{Peso do tecido}}$$

Em que:

- Abs Am. = absorvância da amostra;
- [padrão glicogênio] = concentração padrão de glicose (100 nmoles);
- diluição = diluição do extrato (músculo = 16 vezes; fígado = 80 vezes);
- Abs Pb. = absorvância padrão;
- Peso do tecido = 200 mg de músculo e 50 mg de fígado.

Unidade de medida: 0,1 μ moles glicogênio/g tecido

3.10.3.PERCENTUAL DE GORDURA

A análise de percentual de gordura foi realizada utilizando-se dos tecidos fígado, músculo gastrocnêmio, tecido adiposo marrom, tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal e visceral. Os tecidos foram saponificados e a extração dos lipídios foi realizada pelo método gravimétrico previamente padronizado (Robinson e Willianson, 1978).

3.10.4.ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO

As determinações bioquímicas do soro de colesterol total, HDL-colesterol e Triglicerídeos, foram realizadas por Kits enzimáticos colorimétricos específicos da Laborlab®, e a unidade de medida utilizada é mg/dL.

O LDL - colesterol foi quantificado utilizando-se o método de Friedewa. W.T. et al, 1972, onde $\text{LDL-colesterol} = \text{Colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - (\text{Triglicerídeos}/5)$.

3.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram anotados em fichas próprias para cada análise e, posteriormente, tratados por procedimentos estatísticos compatíveis com os objetivos propostos.

A metodologia estatística utilizada para todas as variáveis no presente foi o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e a análise de variância “*Anova two way*”, com uso do teste de post-hoc (Tukey-Kramer para múltiplas comparações) para verificação de diferença estatística entre as médias com nível de significância de 0.001, por meio do programa Instat 3.0 for *Windows*.

O quantidade de amostras de cada grupo foi de 8 ($n=8$), com exceção da análise morfológica dos adipócitos 2000 células ($n =2000$) por tecido, por grupo, totalizando 48.000 unidades celulares.

As comparações dos animais alimentados com a mesma dieta foram definidas pelas diferentes letras subscritas onde a x S (sedentários), b x SL (sedentários tratados com laser) e c x E (exercitados); a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas foi definida pelo subscrito d (S x S, T x T, SL x SL e TI x TL)

4. RESULTADOS

4.1.DELTA DA MASSA CORPORAL

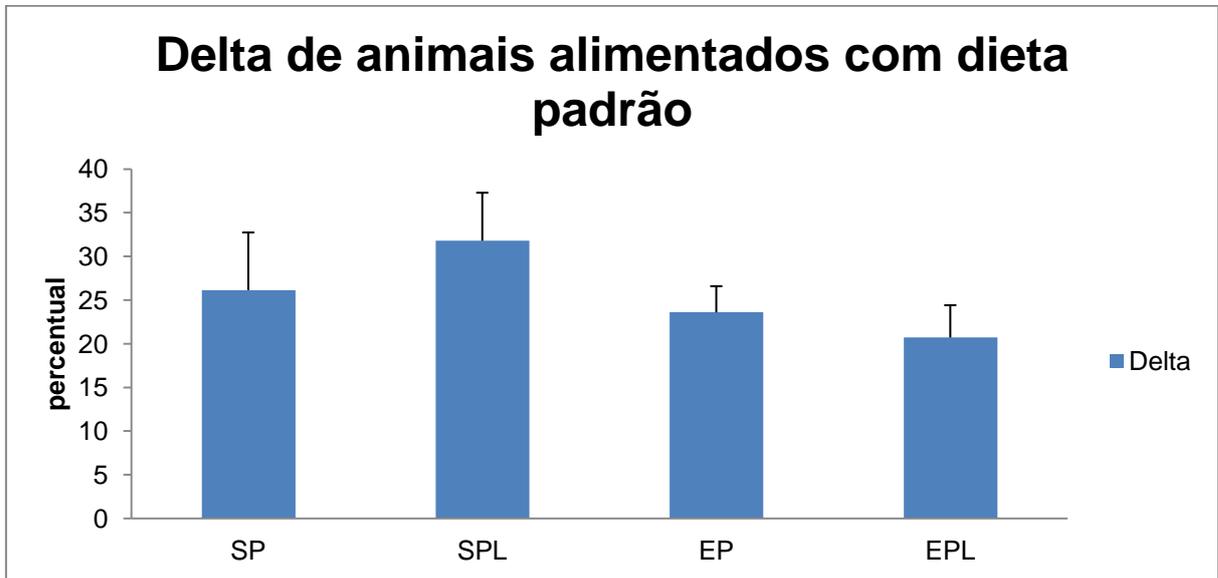


Gráfico 1. Comparação entre os deltas de massa corporal de animais alimentados com dieta padrão. Valores expressos em média e desvio padrão. Não houve diferença significativa em os grupos.

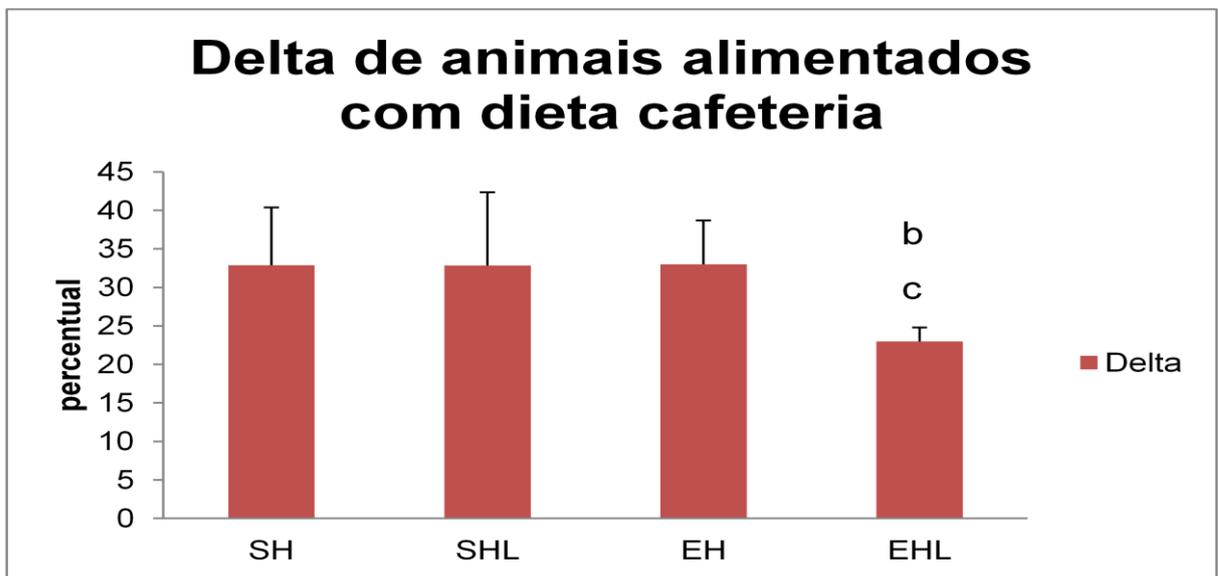


Gráfico 2. Comparação entre os deltas de massa corporal de animais alimentados com dieta cafeteria. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre os grupos SHL x EHL e EH x EHL (subscritos b e c respectivamente).

O gráfico 1, representa o delta de animais alimentados com dieta padrão, não apresentou diferença significativa. O gráfico 2, representa o delta dos animais alimentados com dieta cafeteria mostrou-se significativo entre os grupos SHL x EHL e EH x EHL, apontando diminuição nas duas comparações em relação ao grupo exercitado hipercalórico laser (EHL), para $p < 0.001$.

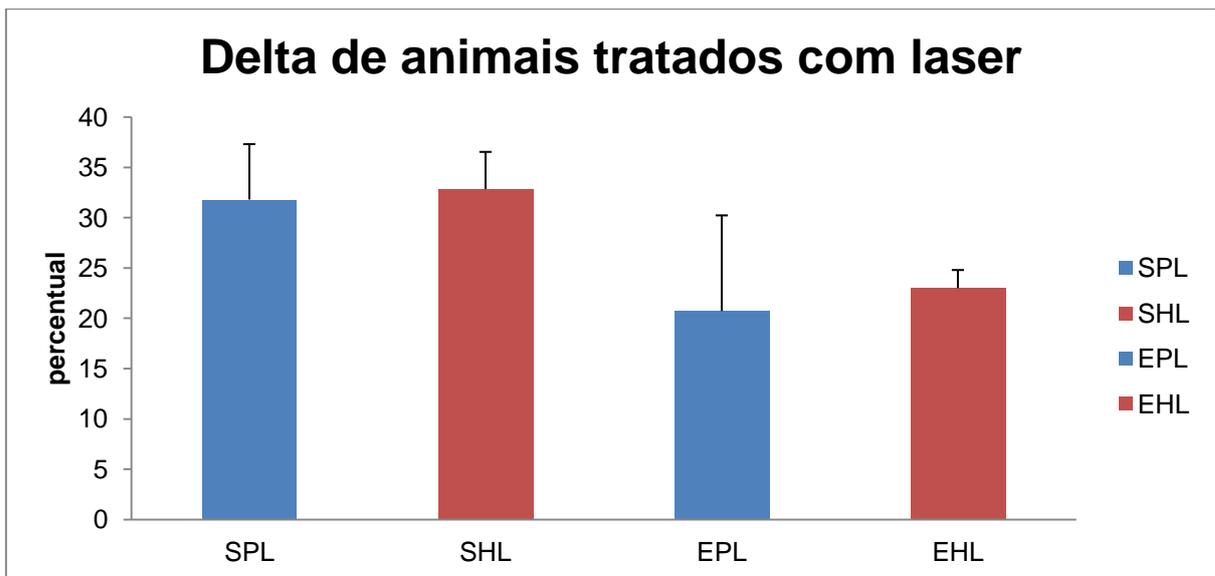


Gráfico 3. Comparação entre animais sedentários que receberam tratamento de laser (SPL x SHL) e exercitados que receberam tratamento com laser (EPL x EHL). Valores expressos em média e desvio padrão. Não houve diferença significativa.

O gráfico 3, que mostra a comparação entre os grupos sedentários padrão e cafeteria que receberam laser (SPL x SHL) não mostrou diferença significativa. Também não se mostrou diferente a comparação entre os grupos exercitados padrão e cafeteria que receberam tratamento com laser (EPL x EHL).

4.2.CONSUMO ALIMENTAR

Tabela 1. Consumo Alimentar

Grupos	Inicial	S2	S4	S6	Final
SP	22±2	23±3	30±7	24±5	25±6
SPL	22±3	23±3	26±9	25±7	26±7
EP	25±7	25±7	30±5	32±6	35±2
EPL	39±5 ^{bc}	40±4 ^{bc}	36±4	40±3 ^{bc}	37±2 ^c
SH	31±4	25±6	27±6	29±2	33±5
SHL	28±2	23±3	25±7	28±3	32±4
EH	25±4	29±6	36±6	34±2	35±5
EHL	34±7	34±7	33±8	38±2	36±4

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.05$. Comparação entre animais alimentados com a mesma dieta, (diferentes subscritos, sendo a x SP ou SH, b x SPL ou SHL e c x EP ou EH).

Os valores de consumo alimentar expressos acima (Tabela 1) mostram que apenas a relação entre os grupos normocalóricos EP x EPL mostram diferença significativa ($p < 0.05$), representando aumento do consumo em quatro dos cinco pontos analisados. Os demais grupos permaneceram inalterados. As comparações entre dietas não se mostraram significativas.

4.3.QUANTIFICAÇÃO DE KCAL.

Tabela 2. Valores totais de calorias ingeridas por gramas de dieta consumida ao longo de todo período experimental.

Grupos	Inicial (Kcal/g)	Final (Kcal/g)	Total (Kcal/g)
SP	582,12	661,50	7461,72
SPL	582,12	687,96	7620,48
EP	661,50	926,10	9525,60
EPL	1031,94	979,02	12065,76
SH	1039,43	1106,49	12875,52
SHL	938,84	1072,96	12070,80
EH	838,25	1173,55	12070,80
EHL	1140,02	1207,08	14082,60

Valor Kcal de 3,78 Kcal/g da dieta normocalórica/padrão e 4,79 Kcal/g da dieta hipercalórica/cafeteria.

Os valores expressos acima (Tabela 2) não mostram diferença significativa e grande semelhança entre os grupos.

4.4.PESO RELATIVO DOS TECIDOS

Tabela 3. Peso relativo dos tecidos (g/100g PC).

	Coração	Fígado	Gastrocnêmio	Sóleo
SP	0.28±0.10	2.66±0.29	0.45±0.10	0.04±0.00
SPL	0.35±0.02	2.52±0.34	0.49±0.03	0.04±0.00
EP	0.36±0.01	2.28±0.32	0.55±0.03	0.04±0.01
EPL	0.38±0.04	2.54±0.20	0.52±0.04	0.04±0.00
SH	0.33±0.03	2.28±0.32	0.49±0.03	0.04±0.00
SHL	0.33±0.02	2.54±0.20	0.47±0.01	0.04±0.00
EH	0.35±0.04	2.28±0.18	0.52±0.02	0.04±0.00
EHL	0.36±0.02	2.48±0.12	0.51±0.02	0.04±0.00

Valores expressos em média e desvio padrão. Não houve diferença significativa.

O peso relativo dos tecidos, tanto em grupos alimentados com dieta padrão quanto os grupos alimentados com dieta cafeteria não mostraram alteração quando analisados os seguintes tecidos: coração, fígado, músculo gastrocnêmio e músculo sóleo (Tabela 3).

Tabela 4. Peso relativo dos tecidos adiposos (g/100g PC).

	TAM	EPI	RET	VIS
SP	0.07±0.02	0.78±0.11	0.74±0.16	0.69±0.16
SPL	0.06±0.01	1.13±0.26 ^a	1.37±0.26 ^a	0.81±0.11
EP	0.09±0.01	0.79±0.12	1.04±0.29	0.70±0.25
EPL	0.09±0.02	0.67±0.09 ^c	0.77±0.17 ^{b,c,d}	0.73±0.13
SH	0.11±0.04 ^d	1.38±0.23 ^d	2.09±0.50 ^d	0.99±0.16 ^d
SHL	0.08±0.01	1.47±0.07	2.19±0.37 ^d	0.99±0.15
EH	0.10±0.01	1.13±0.14	1.47±0.19 ^a	1.06±0.11 ^d
EHL	0.10±0.01	1.29±0.21 ^d	1.53±0.12 ^{b,d}	1.25±0.23 ^d

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.05$. Comparação entre animais alimentados com a mesma dieta, sendo a x S, b x SL e c x E. A comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas é representada por d.

Quando comparados grupos alimentados com dieta normocalórica, o tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal obtiveram resultados semelhantes (Tabela 4). Quando comparados os grupos SP x SPL, houve aumento dos tecidos em questão, enquanto quando comparado o grupo EPL com seu controle exercitado (EP) o resultado mostra uma inversão, diminuindo seu peso relativo. Em ambos os casos, a diferença encontrada foi de $p < 0.001$.

O tecido adiposo branco retroperitoneal dos grupos alimentados com dieta hipercalórica mostram indiferença entre SH x TH (diminuição) e SHL x THL (aumento) para $p < 0.001$, diminuindo em ambos os casos. Quando comparados os tratamentos entre as diferentes dietas, encontramos um aumento significativo dos tecidos adiposos brancos epididimal (SN x SH, EPL x EHL) retroperitoneal (SN x SH, SNL x SHL e EPI x EHL) e visceral (SN x SH, TN x TH e TNL x THL), para $p < 0.001$ (Tabela 4).

4.5. ANÁLISE DE GLICOGÊNIO

Tabela 5. Glicogênio muscular e hepático.

	Fígado	Gastrocnêmio	Sóleo
SP	0,80±0,41	0,29±0,03	0,38±0,09
SPL	0,87±0,23	0,31±0,02	0,35±0,16
EP	1,06±0,42	0,31±0,02	0,36±0,05
EPL	1,04±0,23	0,28±0,08	0,35±0,08
SH	0,78±0,13	0,30±0,02	0,37±0,07
SHL	0,87±0,13	0,39±0,06 ^a	0,38±0,14
EH	1,00±0,08	0,29±0,03	0,22±0,04 ^d
EHL	1,68±0,34 ^{bcd}	0,30±0,02 ^b	0,57±0,17 ^{cd}

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados dieta cafeteria (diferentes subscritos onde, a x SH, b x SHL e c x EH, e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas é representada por d).

A análise de glicogênio muscular e hepático dos grupos normocalóricos quando comparados entre si não mostrou diferença (Tabela 5).

Quando comparados os grupos hipercalóricos, o valor do glicogênio muscular obtido no músculo gastrocnêmio foi maior na comparação SH x SHL e menor na comparação SHL x THL. Ainda nesse sentido, os valores obtidos nas comparações entre SHL x EHL e EH x EHL para o fígado e EH x EHL para o músculo sóleo, mostraram-se elevados e diferentes significativamente, para $p < 0.001$ (Tabela 5).

A comparação entre os grupos de diferentes dietas (Tabela 5) mostrou diminuição significativa para a comparação EP x EH ($p < 0.001$) e aumento significativo entre os grupos EPL x EHL para fígado e músculo sóleo ($p < 0.001$).

4.6.PERCENTUAL DE GORDURA DOS TECIDOS

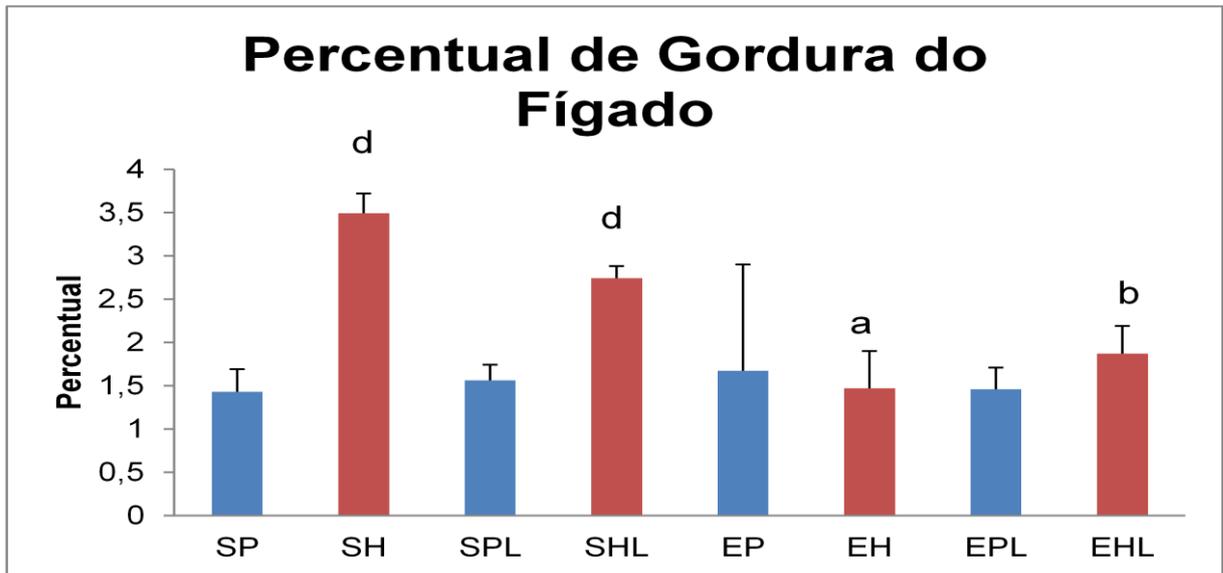


Gráfico 4. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ e $p < 0.05$ entre as comparações dos animais alimentados dieta cafeteria (diferentes subscritos onde, a x SH e b x SHL respectivamente) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

Não houve diferença entre os grupos tratados com dieta padrão (Gráfico 4). Quando comparados os grupos alimentados com dieta cafeteria, o percentual de gordura do fígado mostrou-se menor para SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. As comparações do mesmo tratamento entre diferentes dietas mostrou ser significativa para SP x SH e SPL x SHL, para $p < 0.001$, havendo aumento dos valores mensurados.

Tabela 6. Percentual de gordura de tecidos.

	TAM	EPI	RET	VIS	GAST
SP	29,8±18	82,9±6	84,5±7,8	44,7±10	0,36±0,1
SPL	23,7±10	76,7±5	78±8,6	59,8±7 ^a	0,37±0,1
EP	26,7±7	82±6,8	86±7,5	42,7±11	0,34±0,1
EPL	21,3±7,5	80±8,9	78±7,6	47,1±8,8 ^b	0,37±0,1
SH	35±8,8	87,3±9	84±10	55,9±7	0,43±0,1
SHL	26,6±14	79±6	79,5±10	67±8	0,43±0,1
EH	34±9,7	84,7±8,8	83±4	59±11 ^d	0,39±0,1
EHL	21,5±4	82,1±6	84±4,7	63,7±10 ^d	0,37±0,1

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.05$ entre as comparações dos animais alimentados de mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

O percentual de gordura dos tecidos analisados dos grupos alimentados com dieta normocalórica (Tabela 6) mostrou-se significativo para o tecido adiposo branco visceral (SP x SPL e SPL x EPL).

Nenhuma das comparações entre os grupos hipercalóricos foi significativa. Quando analisadas as comparações do mesmo tratamento entre as diferentes dietas, observou-se aumento dos valores entre EP x EH e EPL x EHL para o tecido adiposo branco visceral para $p < 0.001$ (Tabela 6).

4.7.ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO

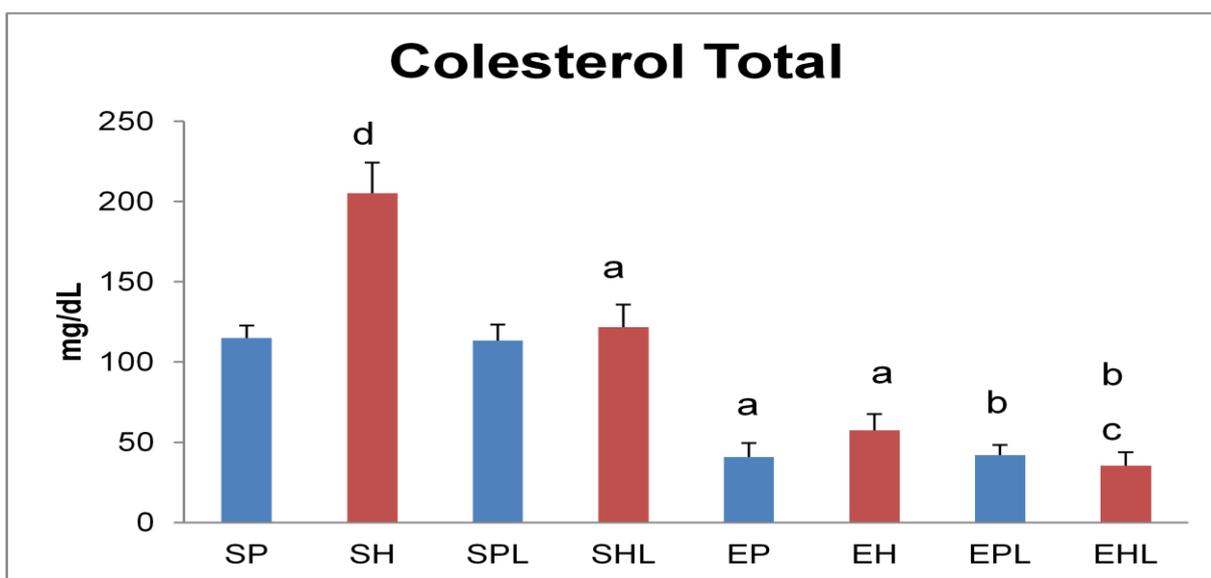


Gráfico 5. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises bioquímicas de colesterol total apresentaram vários resultados de significância. As comparações entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x EP, SPL x EPL, foram observadas diferenças significativas para $p < 0.001$.

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, observou-se diminuição para SH x SHL, EH x EHL, SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. Quando comparado o mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH foi constatado aumento ($p < 0.001$).

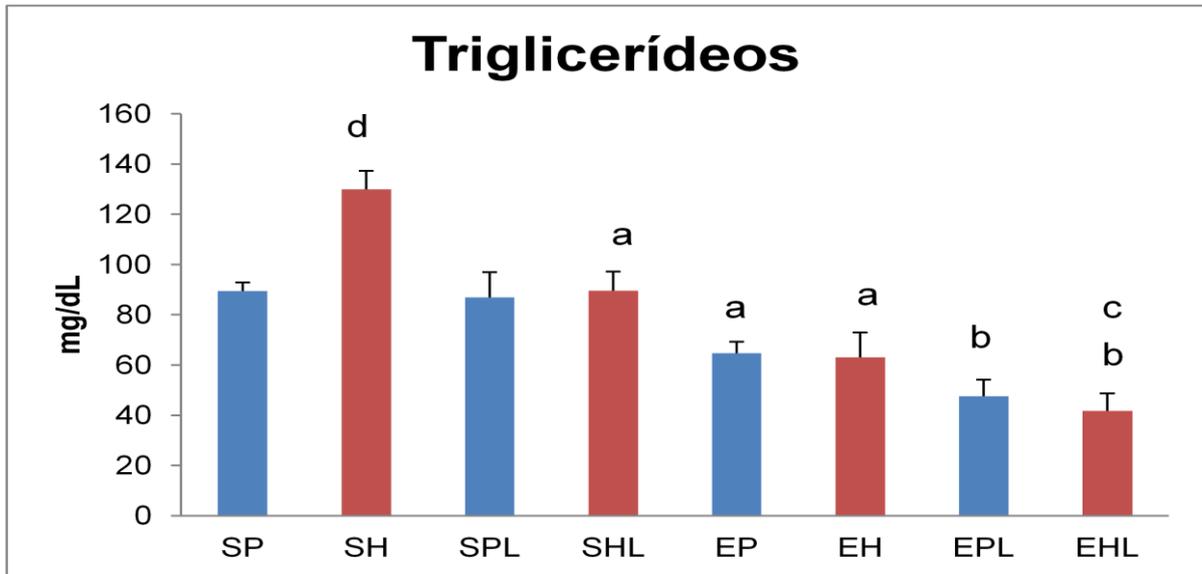


Gráfico 6. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises bioquímicas de triglicerídeos apresentaram diferenças significativas. As comparações entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x EP, SPL x EPL, mostraram diminuição para $p < 0.001$.

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, observou-se diminuição para SH x SHL, EH x EHL, SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. Quando comparado o mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH foi constatado aumento ($p < 0.001$).

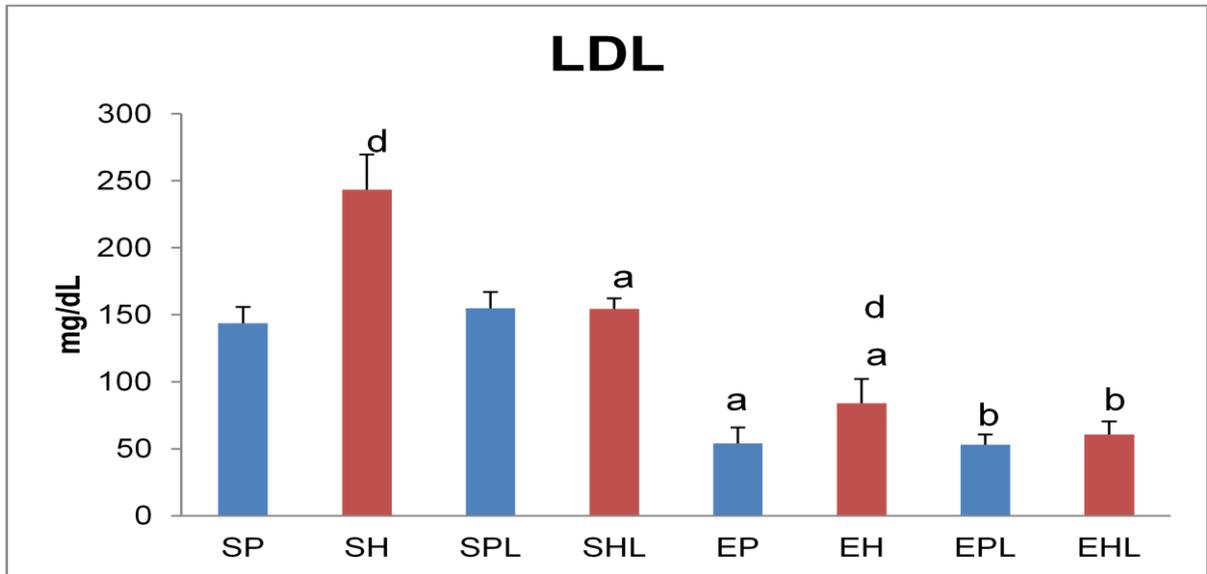


Gráfico 7. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises lipoproteína de baixa densidade (LDL) apresentaram resultados de significância. As comparações entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x EP, SPL x EPL, foram observadas diferenças significativas para $p < 0.001$.

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, observou-se diminuição para SH x SHL, SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. Quando comparado o mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH e EP x EH apresentaram aumento ($p < 0.001$).

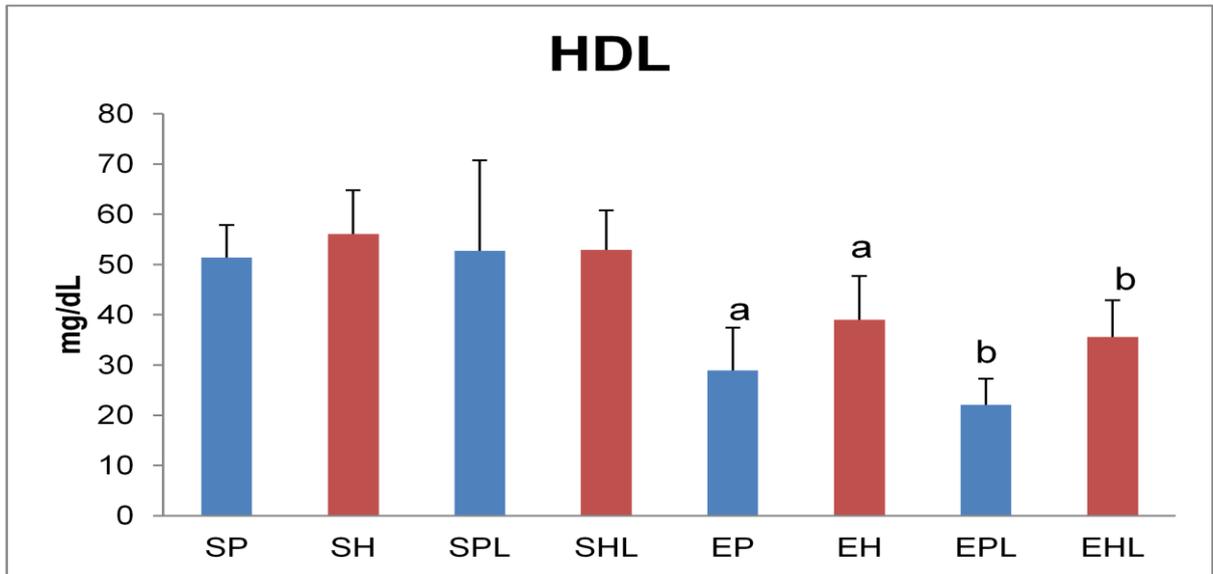


Gráfico 8. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ (SH x EH e SNL x TNL) e $p < 0.05$ (SHL x THL e SN x TN) entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E).

As análises bioquímicas de lipoproteína de alta densidade (HDL) apresentaram significância. As comparações entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x EP, SPL x EPL, mostraram diminuição de seus valores ($p < 0.001$).

Em relação às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, observou-se diminuição para EH x EHL e SHL x EHL para $p < 0.001$.

4.8.ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

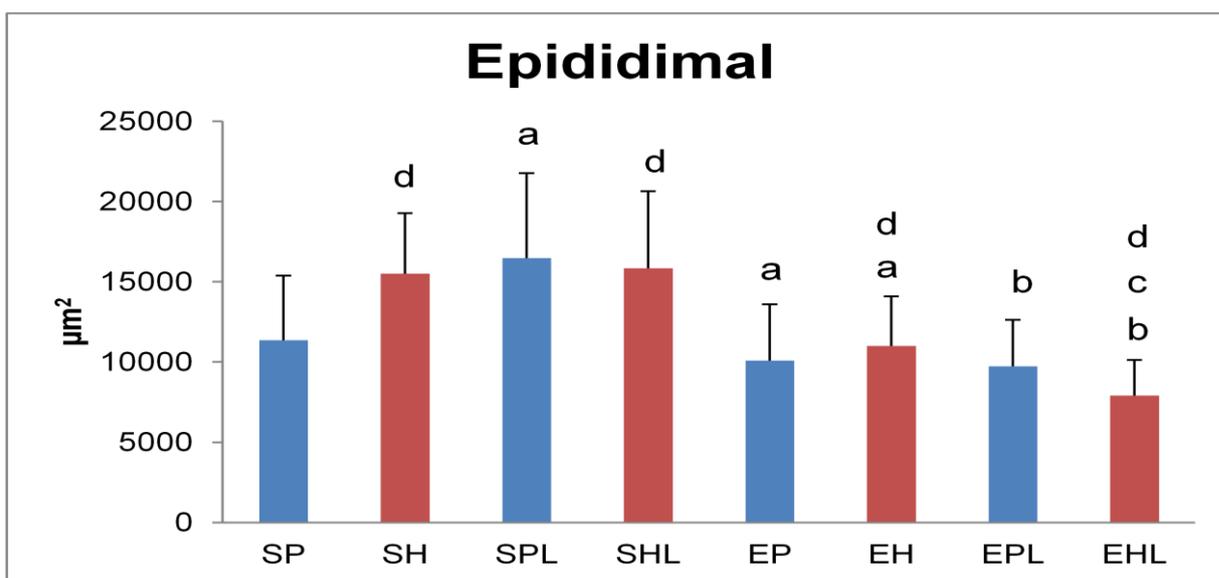


Gráfico 9. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises de adipócitos do tecido adiposo branco epididimal apresentaram vários resultados de significantes. A comparação entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x SPL, mostraram aumento, enquanto as comparações SP x EP, SPL x EPL, apresentaram diminuição da área do adipócito ($p < 0.001$).

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, constatou-se diminuição para EH x EHL, SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. Quando comparado o mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH e EP x EH mostraram aumento e diminuição para SPL x SHL e EPL x EHL ($p < 0.001$).

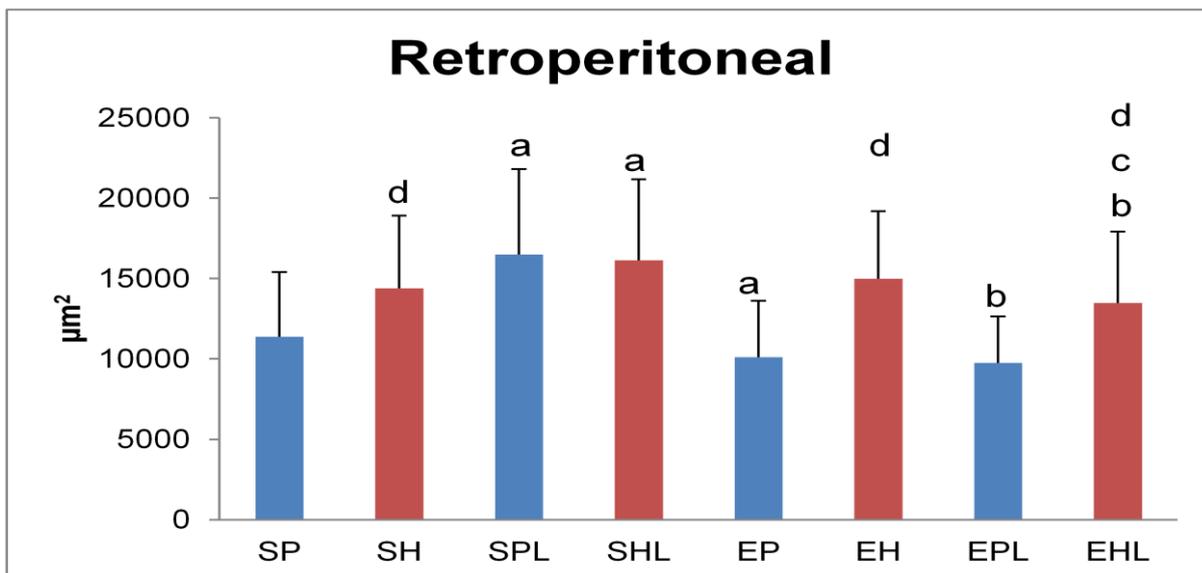


Gráfico 10. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises de adipócitos do tecido adiposo branco retroperitoneal apresentaram diferenças significativas. A comparação entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x SPL, mostraram aumento, enquanto as comparações SP x EP, SPL x EPL, apresentaram diminuição da área do adipócito ($p < 0.001$).

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta hipercalórica, constatou-se aumento para SH x SHL e diminuição para EH x EHL, SH x EH e SHL x EHL para $p < 0.001$. A comparação do mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH, EP x EH e EPL x EHL mostraram aumento significativo ($p < 0.001$).

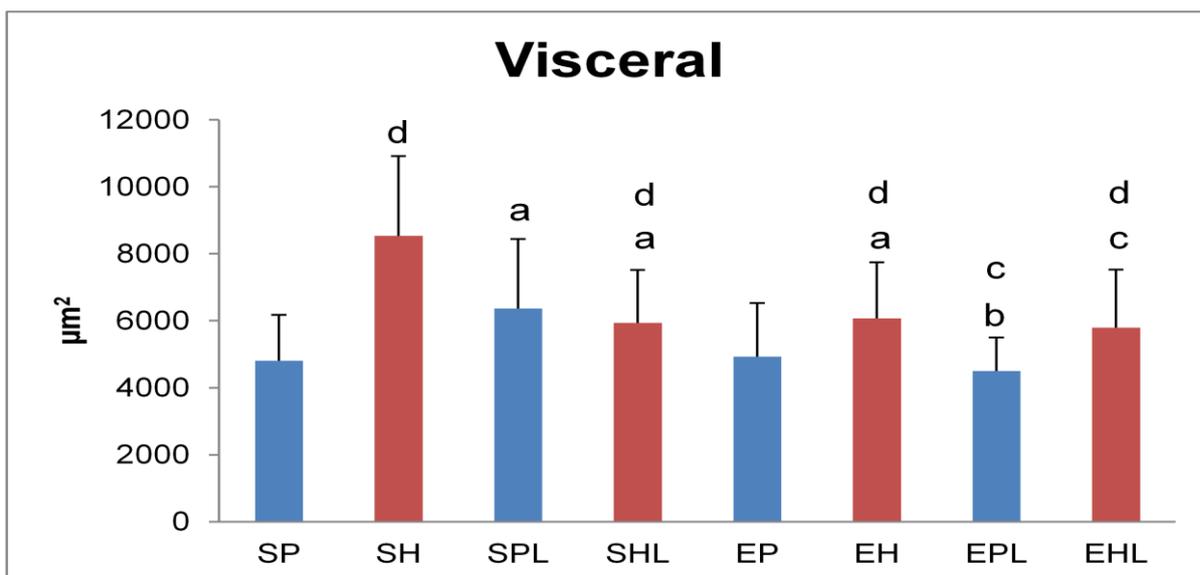


Gráfico 11. Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

As análises de adipócitos do tecido adiposo branco visceral apresentaram alterações significativas. A comparação entre grupos alimentados com dieta padrão, SP x SPL, mostraram aumento, enquanto as comparações EP x EPL, SPL x EPL, apresentaram diminuição da área do adipócito ($p < 0.001$).

Quanto às comparações entre grupos alimentados com a dieta cafeteria, houve diminuição para SH x SHL, EH x EHL, SH x EH e SHL x EHL ($p < 0.001$). Na comparação do mesmo tratamento para diferentes dietas, SP x SH, EP x EH e EPL x EHL mostraram aumento significativo ($p < 0.001$), enquanto SPL x SHL mostrou diminuição da área.

5. DISCUSSÃO

Em meio a uma busca na literatura, que abrangue várias palavras chave pertinentes a este estudo, foi encontrada uma carência de trabalhos que validassem ou que encaminhassem a partir dos resultados apresentados uma sustentação plausível para a existência de hipóteses que pudessem explicar os efeitos do laser em atuação sistêmica, principalmente no perfil lipídico e adipócitos. Este foi o primeiro estudo controlado e randomizado que teve por objetivo avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade sobre animais alimentados com diferentes dietas e que tiveram ou não o estímulo do exercício moderado. O controle realizado durante todo o período experimental permitiu que fosse possível o delineamento de hipóteses (figura 8) que explicassem as vias de ocorrência da atuação da fototerapia e a sua interação com a dieta rica em gordura, exercício crônico ou ambos.

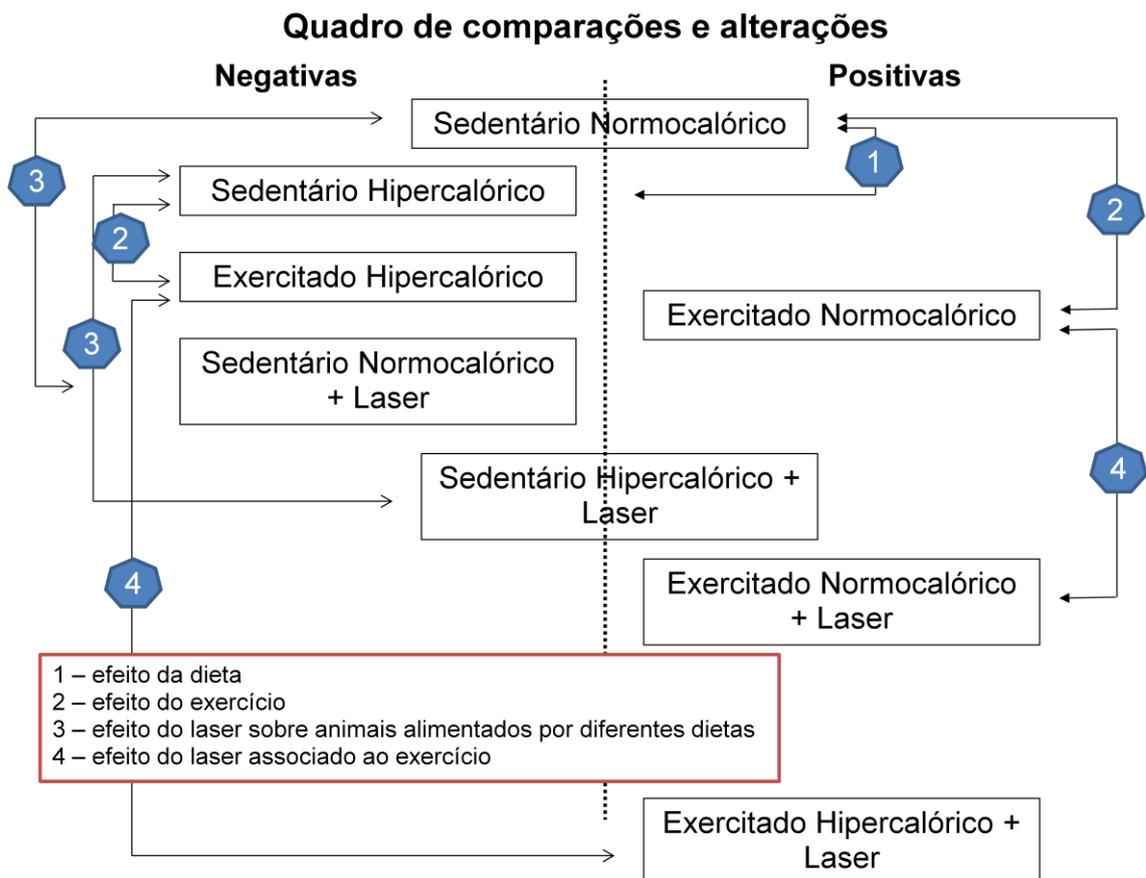


Figura 6. Quadro de comparações e alterações positivas e negativas.

5.1.EFEITO DA DIETA

O efeito das dietas normocalórica e hipercalórica sobre o organismo já é conhecido pela literatura (Estadella et al., 2004;. Duarte et al., 2008; Sene-Fiorese et al, 2008).

A indução da obesidade experimental tem sido um modelo útil e é representada por dietas hipercalóricas enriquecidas por lipídios ou carboidratos (Bueno et al., 2011). É constatado que a elevação do conteúdo lipídico das dietas podem promover inibição das enzimas responsáveis pelo processo da lipogênese e da síntese “de novo” de lipídios pelo tecido adiposo (Curi, 2002). Esta relação entre a dieta rica em gordura com a adiposidade central e visceral tem sido amplamente estudada assim como o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis e obesidade (Duarte et al., 2012; Tock et al., 2006; Manzoni, 2005). Além disso, o tecido adiposo branco é o mais importante sítio de regulação extra-hepático do metabolismo lipídico (Bueno et al., 2011), onde pequenas alterações podem provocar mudanças sistêmicas.

Segundo Duarte et al. (2008), animais alimentados com dieta hipercalórica durante um período de três semanas, desenvolveram obesidade central e aumento dos valores lipídicos sanguíneos (colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade), quando comparados com animais alimentados com dieta normocalórica. Em outro estudo, Bernardes et al. (2004) encontrou além do aumento dos tecidos adiposos brancos, o aumento do tecido adiposo marrom. Além disso, também encontrou aumento dos valores de colesterol total e triglicerídeos.

No presente estudo, de oito semanas, estes fatos corroboram com os resultados encontrados. Foram obtidos aumento do peso relativo dos tecidos brancos de gordura (epididimal, retroperitoneal e visceral – tabela 4), aumento do tecido adiposo marrom (Tabela 4), aumento dos valores do perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos e LDL gráficos 5, 6 e 7) e aumento da área dos adipócitos (gráficos 9, 10 e 11) nos três tecidos analisados (epididimal, retroperitoneal e visceral).

Além disso, o consumo alimentar e ganho de massa corporal em animais alimentados com dieta hipercalórica tem apresentado resultados controversos ao longo de diversos estudos (Estadella et al., 2004; Bernardes et al., 2004; Duarte et al., 2008; Sene-Fiorese et al., 2008; Duarte et al., 2012). Neste trabalho, não houve diferença no consumo alimentar (tabela 1), ganho de massa corporal (anexo 1) e no delta da massa corporal (anexo 2).

O aumento do percentual de gordura do fígado, encontrado por Duarte et al. (2008) e Sene-Fiorese et al. (2008), também vai de encontro aos nossos resultados (gráfico 4).

5.2.EFEITO DO LASER ASSOCIADO A DIFERENTES DIETAS

A utilização da fototerapia fundamentada em grande parte por Tiina Karu apontam como mudanças advindas do uso do laser a alteração do metabolismo celular como resultado da absorção da luz pela enzima citocromo c oxidase, uma enzima terminal na cadeia transportadora de elétrons, que funciona como um foto acceptor na alteração do metabolismo celular (Karu et al., 2003) e aumento da taxa de síntese de DNA (Karu et al., 2005), proporcionando um fenômeno conhecido por fotobiomodulação.

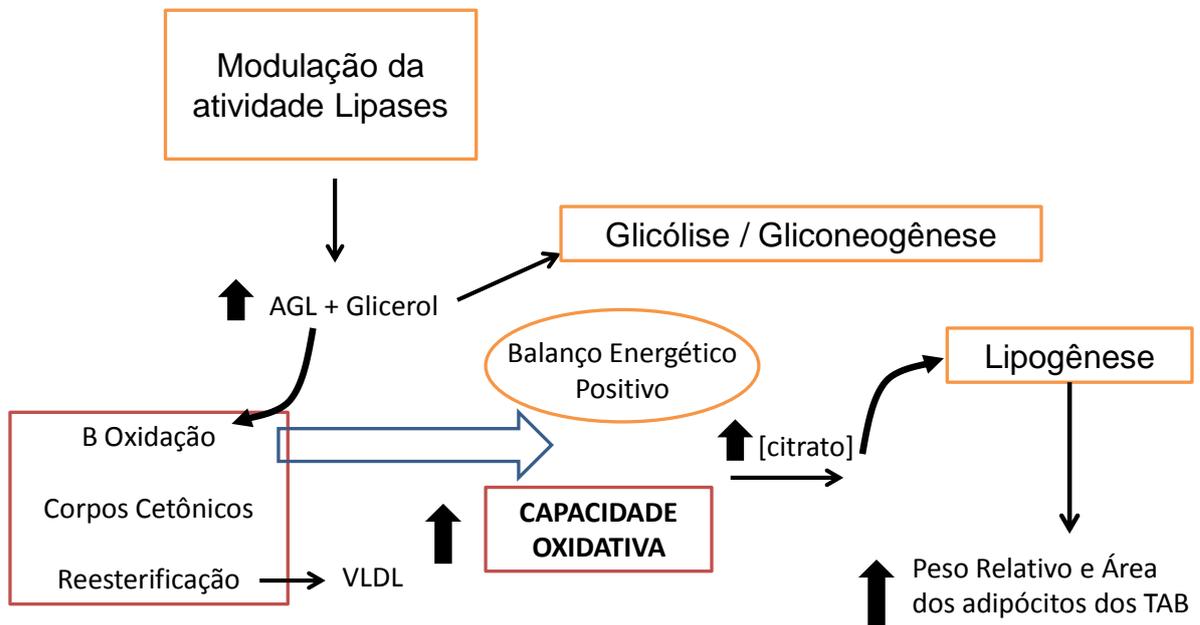
Ainda neste sentido, outros estudos confirmam a ação da luz sobre o metabolismo energético celular através de mecanismos químicos que promovem a ativação ou a mudança do estado redox de componentes da cadeia respiratória da mitocôndria, principalmente o citocromo c oxidase e o NADH desidrogenase (enzima localizada na membrana mitocondrial interna, que catalisa a transferência de elétrons) (Vladimirov et al., 2004; Paolillo et al., 2011a), além de alterações estruturais importantes como a formação das mitocôndrias gigantes (Bakeeva et al., 1993). Ainda segundo Azeemi et al.(2008) a utilização de espectros de luz proporciona alterações enzimáticas, principalmente sobre as lipases (Azeemi et al., 2008).

Sabe-se que o laser age como modulador enzimático, aumentando a ação de enzimas oxidativas e das lípases (Azeemi et al., 2008; Mazzorco, 2011), gerando uma maior capacidade oxidativa e disponibilidade de substrato energético. Entretanto, observa-se no presente estudo nos animais sedentários alimentados com dieta padrão (Figura 7) que, pelo fato de não haver demanda por energia, ocorreu o armazenamento dos substratos, efeitos observados pela maior área dos adipócitos de todos os tecidos adiposos analisados (gráficos 9, 10, 11) associado ao aumento do peso relativo dos tecidos adiposos branco epididimal e retroperitoneal (Tabela 4). Além disso, apesar da dieta hiperlipídica não ter promovido redução nos estoques de glicogênio muscular e hepático nos animais sedentários, conforme descrito na literatura (Bernardes et al., 2004), quando associamos a fototerapia, observamos um aumento da concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio (tabela 5), sugerindo modificações na ação da dieta sobre o metabolismo dos carboidratos.

Por outro lado, na vigência da dieta hipercalórica (figura 8), a ação moduladora sobre as enzimas promovida pela fototerapia foi mais pronunciada, diminuindo o perfil lipídico (gráficos 5,6,7) e aumentou a área dos adipócitos do tecido adiposo branco retroperitoneal desses animais (grafico10).

Por sua vez, o tecido adiposo visceral, pela sua característica lipolítica, está associado ao fluxo direto de ácido graxo livre para sistema porta-hepático (Rodríguez et al., 2007; Clement & Langin, 2007), mas quando está associado a uma dieta rica em gordura podendo levar ao maior acúmulo de gordura no fígado (Sene-Fiorese et al, 2008). Entretanto, o tratamento com a fototerapia não foi eficiente em relação ao acúmulo de gordura no fígado promovido pela dieta hiperlipídica (gráfico 4). Apesar disso, foi observado no presente estudo, uma menor área dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral (gráfico 11) que é um efeito benéfico uma vez que este tecido está associado ao desenvolvimento da síndrome metabólica (Dizdar & Alymaç, 2004; Caranti et al, 2007).

EFEITO DO LASER ASSOCIADO A DIETA NORMOCALÓRICA



1

Figura 7. Quadro de efeito do laser quando associado à dieta normocalórica. Observa-se que, em teoria, ocorre a modulação da ação das lipases, gerando hidrólise das unidades de triglicérides, formando (AGL) ácidos graxos livres e glicerol. O AGL pode ser utilizado em três diferentes vias, mas devido a uma demanda energética diminuída devido ao sedentarismo, a via da Beta-oxidação encontra-se diminuída, gerando um balanço energético positivo e por consequência aumento de citrato mitocondrial, aumentando a lipogênese e gerando aumento dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos. O Glicerol pode ser consumido nas vias Glicólise ou Gliconeogênese, de acordo com a necessidade.

EFEITO DO LASER ASSOCIADO A DIETA HIPERCALÓRICA

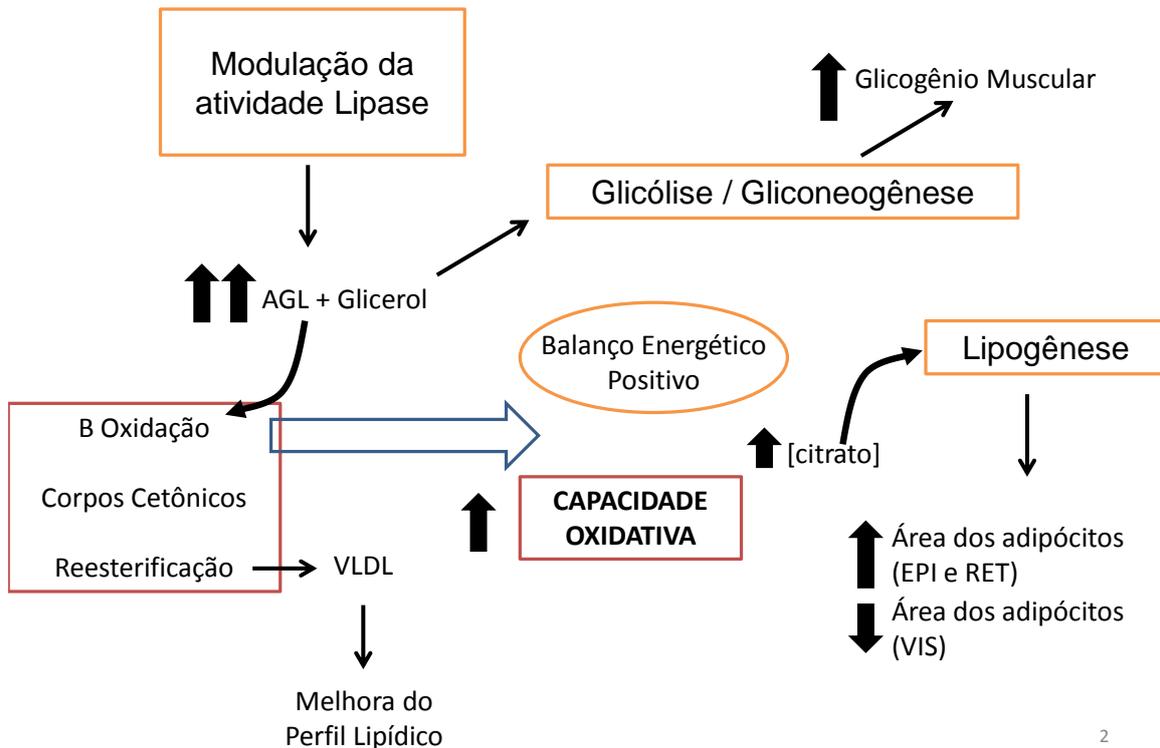


Figura 8. Quadro de efeito do laser quando associado à dieta hipercalórica. Observa-se que, em teoria, ocorre a modulação da ação das lipases, gerando hidrólise das unidades de triglicérides, formando (AGL) ácidos graxos livres e glicerol, porém, em maior quantidade em virtude da maior disponibilidade gerada pela dieta rica em gordura. O AGL pode ser utilizado em três diferentes vias, mas devido a uma demanda energética diminuída devido ao sedentarismo, a via da Beta-oxidação encontra-se diminuída, gerando um balanço energético positivo, desta vez ainda maior devido ao aporte energético da dieta vigente e por consequência, aumento de citrato mitocondrial, aumentando a lipogênese e gerando aumento dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal. Constatou-se a diminuição dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral, fato este possivelmente ligado à característica lipolítica do tecido. O Glicerol pode ser consumido nas vias Glicólise ou Gliconeogênese, de acordo com a necessidade. Neste contexto, observou-se aumento dos estoques de glicogênio muscular, caracterizando a via da Gliconeogênese.

5.3.EFEITO DO EXERCÍCIO

O estado da arte dos efeitos do exercício sobre o acúmulo de gordura corporal e perfil lipídico associado ou não a dieta hipercalórica também já está consolidado, mostrando que o papel benéfico do exercício sobre os efeitos do sedentarismo quando associado à dietas ricas em gordura. Dentre os efeitos encontrados que também são vigentes na literatura, observamos o maior controle da massa corporal, a diminuição da área dos adipócitos, diminuição da hipercolesterolemia e a redução da esteatose hepática não alcoólica. Sabe-se também que a intensidade, frequência e duração do exercício são responsáveis por diferentes adaptações metabólicas (Horowitz, 2003; Ruby, 1994; Even, 1998). O exercício de intensidade moderada, como descrito por McArdle (2003) e utilizado neste trabalho, é fundamental para utilização de ácidos graxos como substrato principal na obtenção de energia, uma vez que nesta intensidade, o quociente respiratório favorece a utilização de lipídios como substrato energético. No mesmo sentido, Curi (2002) aponta este substrato como preferencial pelos músculos esqueléticos em exercício de longa duração, já que os lipídios armazenados na forma de triglicérides representam o estoque principal de energia disponível.

Assim, neste trabalho foram constatadas as diminuições dos valores de perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, LDL e HDL – Anexo 3), tanto para animais alimentados com dieta padrão quanto para animais alimentados com dieta cafeteria em grupos submetidos à exercício. No mesmo sentido, os valores encontrados significativamente menores foram encontrados para a área dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal nos grupos alimentados com dieta padrão e tecidos adiposos brancos epididimal e visceral para grupos hipercalóricos (Anexo 4).

A hipótese que parece melhor explicar este “desvio” da obtenção energética por meio do metabolismo dos carboidratos para a utilização do metabolismo dos lipídios é explicado pelo ciclo de Randle, onde mediante o aumento da disponibilidade de ácidos graxos, ocorre a maior oxidação deste e conseqüente diminuição da degradação de glicogênio e da utilização de glicose (Curi, 2002).

Desta forma, os ácidos graxos realizam um papel fundamental na manutenção da atividade física e por consequência torna a lipólise uma etapa limitante neste processo. Outras etapas limitantes são o transporte dos ácidos graxos na corrente sanguínea, a passagem destas unidades lipídicas pelas membranas plasmática e mitocondrial, a beta oxidação, ciclo de Krebs e a atividade da cadeia respiratória de elétrons (Curi et al., 2003).

Além disso, foi encontrada diminuição do percentual de gordura no fígado (Gráfico 4), em animais alimentados com dieta hipercalórica, retornando a níveis semelhantes de animais exercitados e alimentados com a dieta padrão, apontando para uma reversão do quadro de deposição de gordura no fígado, assim como na literatura (Gauthier et al. 2003).

5.4.EFEITO DO LASER ASSOCIADO AO EXERCÍCIO

Os efeitos do exercício aeróbio, como citado anteriormente, já está bem estabelecido na literatura, uma vez que a prática regular de atividade física pode contribuir para a prevenção, controle ou atenuação da obesidade, tanto em estudos experimentais quanto clínicos, por ser um eficiente recurso para promover o aumento do gasto energético (Gauthier et al., 2003; Gauthier et al 2004; Caranti et al., 2007; Horowitz, 1997). Por sua vez, a associação do laser com o exercício na vigência de diferentes dietas e seus efeitos sobre o tecido adiposo ainda permanece pouco explorada.

A hipótese para os possíveis mecanismos de atuação do laser ainda está baseada no aumento da ação da lipase lipoprotéica e lipase hormônio sensível (Azeemi et al., 2008), que para a primeira, aumentaria a hidrólise de triglicerídeos séricos e a segunda a dos armazenados no tecido adiposo. Conseqüentemente haveria uma maior disponibilidade de ácidos graxos, que por sua vez podem ser oxidados ou re-esterificados. Além disso, com a hidrólise do triglicerídeo, tem-se além dos ácidos graxos livres, o glicerol que pode ser utilizado como substrato para a síntese de glicose ou glicogênio pela via da gliconeogênese (Mazzorco, 2011).

Pelos resultados obtidos no presente estudo, o exercício *per si* não foi suficiente para promover mudanças no peso relativo dos tecidos adiposos brancos e tampouco alterar a área dos adipócitos do tecido adiposo visceral, somente melhora no perfil lipídico, quando associado à dieta padrão (figura 9).

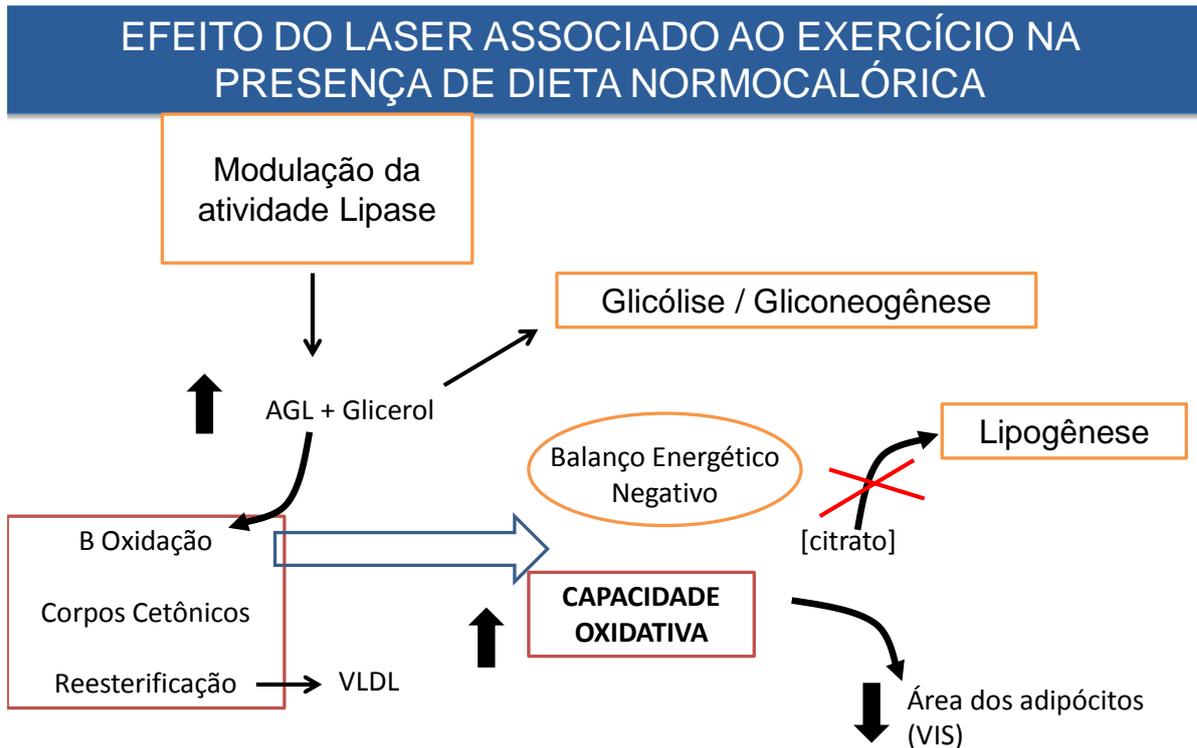
Por outro lado, para a mesma dieta (figura 9), os animais tratados com laser associado ao exercício apresentaram uma redução significativa no peso relativo dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal (tabela 4) e na área dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral (gráfico 11) e a manutenção do perfil lipídico (gráficos 5-8), quando comparados aos animais do grupo exercitado dieta padrão (EP). Além disso, os efeitos descritos acima foram o inverso dos observados nos animais sedentários alimentados com dieta padrão e tratados com laser, reforçando o papel fundamental da demanda energética, a qual deixaria de ser fator limitante, assim como o limite de processamento do substrato pela mitocôndria, já que esta estaria aumentada em tamanho (Bakeeva et al., 1993).

Considerando todas as ações da fototerapia sobre o metabolismo lipídico, a somatória deste mecanismo com o exercício na vigência da dieta hipercalórica, mostrou-se extremamente eficiente, tornando-se o nosso principal resultado (figura 10).

A associação do exercício e laser na vigência da dieta hipercalórica promoveu diminuição dos lipídios circulantes (gráficos 5 e 6), diminuição da área dos adipócitos dos tecidos adiposos branco epididimal, retroperitoneal e visceral (gráficos 5, 6, 7), além de um menor ganho de massa corporal ao longo do período experimental (gráfico 2). Isto vem de encontro ao fato de que o consumo de dietas ricas em gordura pode promover o aumento da oxidação lipídica durante a prática de exercício, que ocorreria pelo aumento da lipólise, tendo como consequência o aumento nos ácidos graxos circulantes e redução nos estoques de glicogênio muscular e hepático (Bernardes et al.2004).

Em relação aos estoques de glicogênio, observamos que nos animais alimentados com dieta hipercalórica quando associamos o laser ao exercício tem-se uma maior concentração de glicogênio hepático e no músculo sóleo e uma menor concentração no músculo gastrocnêmio quando comparados aos animais somente exercitados para a mesma dieta (tabela 5). Estes achados vêm de encontro com a hipótese de que a na condição de maior hidrólise de triglicerídeo tem-se uma maior

disponibilidade de glicerol, que por sua vez, no período de recuperação ao exercício, pode ser convertido em glicogênio pela via da gliconeogênese (Mazzorco, 2011). Desta forma, os resultados obtidos com relação aos efeitos do exercício associado ao laser em ambas as dietas, sugerem que as limitações apontadas por Curi (2003; 2002) anteriormente citadas, são automaticamente minimizadas pela ação do laser, aumentando a capacidade de conversão de energia por meio da beta oxidação e pelo sugerido aumento mitocondrial (Bakeeva, 1993) bem como também pelo aumento da atividade da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias (Vladimirov et al., 2004; Paolillo et al., 2011a).



3

Figura 9. Quadro de efeito do laser quando associado ao exercício na presença de dieta normocalórica. Observa-se que, em teoria, ocorre a modulação da ação das lípases, gerando hidrólise das unidades de triglicérides, formando (AGL) ácidos graxos livres e glicerol. O AGL pode ser utilizado em três diferentes vias, neste caso, em razão do exercício, existe uma demanda energética aumentada, onde a via da Beta-oxidação encontra-se aumentada por consequência, gerando um balanço energético negativo. Assim, não ocorre aumento de citrato mitocondrial, impedindo a sinalização para início do processo de lipogênese e consequentemente a diminuição dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral. O Glicerol pode ser consumido nas vias Glicólise ou Gliconeogênese, de acordo com a necessidade.

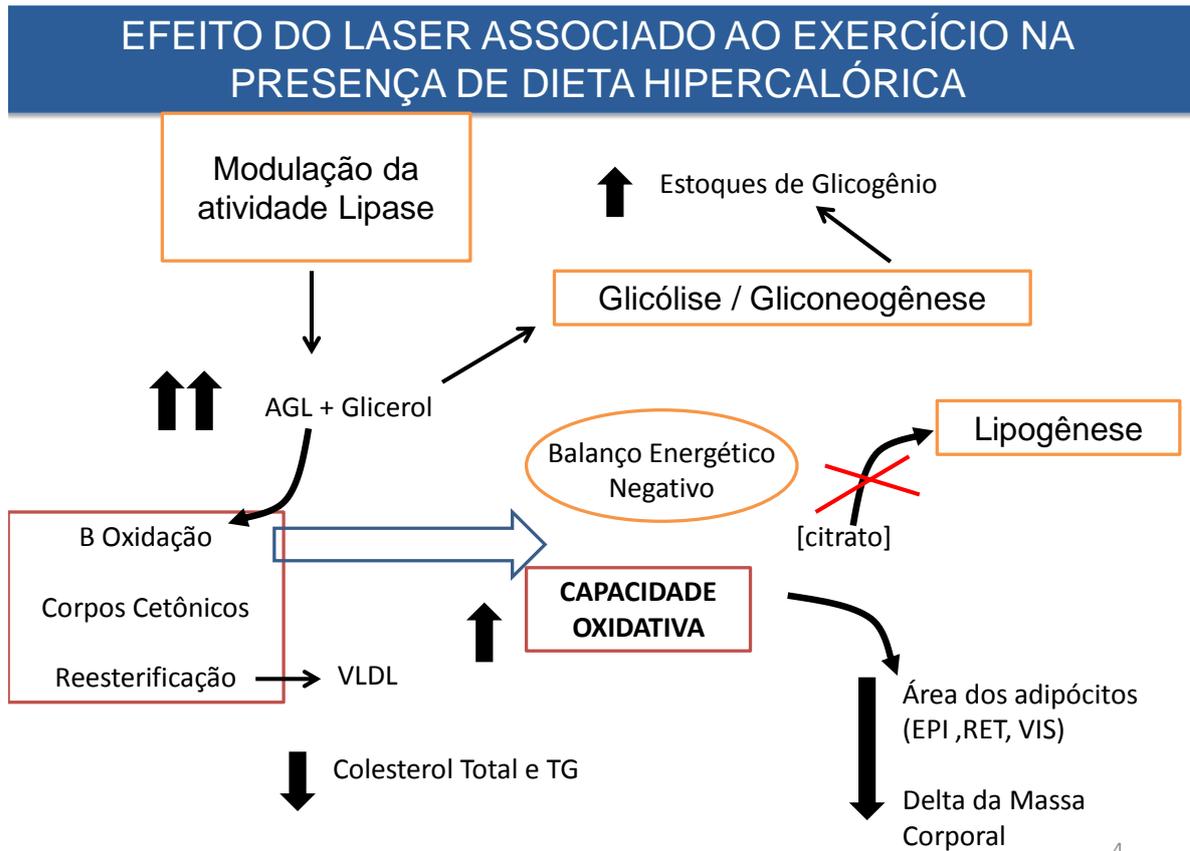


Figura 10. Quadro de efeito do laser quando associado ao exercício na presença de dieta hipercalórica. Observa-se que, em teoria, ocorre a modulação da ação das lípases, gerando hidrólise das unidades de triglicérides, formando (AGL) ácidos graxos livres e glicerol. Em virtude da dieta rica em gordura, ocorre mais disponibilidade de substratos. O AGL tem a possibilidade de serem utilizados em três diferentes vias, neste caso, pela quantidade elevada de substratos, os ácidos graxos podem ser reesterificados e convertidos em VLDL, onde constatamos diminuição dos valores de colesterol total e triglicérides e em razão do exercício, existindo uma demanda energética aumentada, onde a via da Beta-oxidação encontra-se aumentada por consequência, gerando um balanço energético negativo. Assim, não ocorre aumento de citrato mitocondrial, impedindo a sinalização para início do processo de lipogênese e conseqüentemente a diminuição dos adipócitos dos tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal e visceral, além da diminuição do delta da massa corporal. O Glicerol pode ser consumido nas vias Glicólise ou Gliconeogênese, de acordo com a necessidade. Neste caso específico, constatou-se o aumento dos estoques de glicogênio muscular e hepático, sinalizando atuação aumentada da via Gliconeogênese.

6. CONCLUSÃO

O surgimento de novas possibilidades no tratamento da obesidade e de doenças associadas a ela, como por exemplo, as dislipidemias, são imprescindíveis mediante o padrão de comportamento alimentar que a sociedade atual se dispõe a utilizar. A simples mudança de hábitos alimentares é um importante caminho a ser seguido, bem como a realização de exercícios físicos diários que possibilitem não somente o gasto energético como também a melhora da qualidade de vida.

A importância de trabalhos experimentais que possibilitem a interação entre organismos biológicos e tecnologias é fundamental para que o traslado do caráter experimental para o uso clínico seja feito com segurança, solidez e confiança.

A associação entre fototerapia e exercício de intensidade moderada em relação à situação de obesidade experimental induzida foi eficaz para a reversão de quadros de aumento celular, diminuição dos valores lipídicos séricos, tendo influência positiva quanto à diminuição do delta da massa corporal. Assim, a possibilidade de um modelo clínico torna-se interessante mediante adequação da tecnologia empregada no experimento, para a prática clínica multidisciplinar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino Junior A.E., Barreto S.M.G., Okada G.T. (2008) Relação e envolvimento de crianças obesas em aulas de educação física em escola municipal de educação infantil (EMEI) de São Carlos-SP. *Refeld*. 3(1): p1-9.
- Azeemi, S. T., S. M. Raza, et al. (2008). Colors as catalysts in enzymatic reactions. *J Acupunct Meridian Stud* 1(2): p139-142.
- Bagnato, V.S. Laser e suas aplicações em Ciência e tecnologia. 2008a. p.1-87.
- Bagnato, V.S. Novas Técnicas Ópticas. Ed. Livraria da Física. 2008b. p. 1-239.
- Bakeeva, L. E., V. M. Manteifel, et al. (1993) Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. *Mol Biol (Mosk)* 27(3): 608-617.
- Barolet D (2008) Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Sem Cut Med Surgery* 27: p 227-238.
- Bernardes D., Manzoni, M.S.J., et al. (2004) Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Ver. Bras. Educ. Fís. Esp.* 18(2):p 191-200.
- Buckwalter, J.A. (2000). Advancing the science and art of orthopaedics. *The Journal of bone and Joint Surgery*. 82: p1782-1803.
- Caranti, D.A. De Mello, M.T. Prado, W.L. (2007). Short and long-term beneficial effects of a multidisciplinary therapy for the control of metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism*. 56(9). P1293-1230.
- Cheik, N. C. (2002). Efeitos do treinamento físico associado a um produto fermentado de soja na prevenção de dislipidemias e obesidade e ratos adultos machos alimentados com dieta padrão e hipercolesterolêmica. Tese de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos 129p.
- Cinti, S. (2001). The adipose tissue organ: morphological perspectives of adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 60: p319-328.
- Clement K., Langin, D. (2007). Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J inter Med*. 262. P422-430.
- Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C. K.; Procopio, J. Entendendo a Gordura – os ácidos graxos. 1ª Edição. São Paulo. Manole. 2002.

Curi , R., Lagranha, C.J., et al. (2003) Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbio. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 47(2): p135 – 143.

DÂMASO, A. R. (1996). Efeitos do exercício agudo e crônico sobre o metabolismo lipídico e a celularidade adiposa de ratas durante a lactação e 48 horas após o desmame. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. São Paulo. 120p.

Dâmaso, Ana R. *Obesidade*. 1ª Edição. São Paulo. Editora Médice, 2003.

Dâmaso, Ana R. *Obesidade*. 2º Edição. Guanabara Koogan, 2009.

De Campos, Tarcila Beatriz Ferraz (2007). A suplementação crônica com ácido linoléico conjugado promove redução da massa adiposa e compromete a sensibilidade á insulina no tecido adiposo branco periepídídimal. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo. São Paulo. 37p.

De Castro, Natalie Carolina (2009). O Volume celular do adipócito contribui para a heterogeneidade funcional do tecido adiposo branco. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo. São Paulo. 13p.

Dizdar, O. Alymaç. E. (2004). Obesity na endocrine tumor? *Med Hypotheses*. 63(5). p790-792.

Duarte F.O., Sene-Fiorese M., Manzoni M.S.J. , et al. (2008). Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. *Nutrition*. 24(2). p 177-186.

Duarte, F. O., M. Sene-Fiorese, et al. (2012) Food restriction and refeeding induces changes in lipid pathways and fat deposition in the adipose and hepatic tissues in rats with diet-induced obesity. *Exp Physiol*.

Duboie, M.; Gilles, H. A; Hamilton, J.K.; et al. (1956) Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. *Annal. Chem.* 28(3). p.350-8.

Estadella, D.; Oyama, L.M.; Dâmaso, A.R. et al.(2004). Effect of palatable hypercaloric diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*.20(2). p218-224.

Even, P. C., N. Rieth, et al. (1998) Substrate oxidation during exercise in the rat cannot fully account for training-induced changes in macronutrients selection. *Metabolism* 47(7): p777-782.

- Finucane F.M. (2009). Obesity in Irish youth: epidemiology and implications. *Ir J Med Sciv.*178(3). p249-255.
- Friedewa, W.T., Fredrick, D.S Levy, R.I. (1972). Estimation of Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without Use of Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry.* 18(6). p499-502.
- Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A & Lavoie JM (2004). Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, p1064-1071.
- Gauthier MS, Couturier K, Latour JG & Lavoie JM (2003). Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *Journal of Applied Physiology* 94, p2127-2134.
- Hernández-Torres RP, Ramos-Jiménez A, Torres-Durán, et al. (2008). Effects of single sessions of-intensity continuous and moderated-intensity intermittent exercise on blood lipids in the same endurance runners. *J Sci Med Sport.* 12(2).
- Hirsch, J.; Gallian, E. (1968). Methods for determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid. Res.* 9(1). p.110-19.
- Horowitz, J. F. (2003) Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14(8): 386-392.
- Karu,T.I., Pyatibrat, L.V. (2003) Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome oxidase. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: .p211-216.
- Karu, T. I., L. V. Pyatibrat, et al. (2005) Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers in Surgery and Medicine* 36(4): 307-314.
- LOMBARD BC.B.,DEEKS A.A.,BALL K., et al.(2009). Weight, physical activity and dietary behavior change in young mothers: short term results of the HeLP – her cluster randomized controlled trial. *Nutrition Journal.* 8(17): p.1-9.
- McArdle W.D., Katchh F.I., Katch V.L. *Fisiologia do exercício.* 5ªEdição. Guanabara Koogan, 2003.
- Manzoni, M. S. J. ; Rossi, E. A.; Carlos, I. Z., et al. (2005)The fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *Nutrition.* 21(10): p. 1018-1024.
- Mazzorco, A., Torres, B.B.*Bioquímica básica.* 3ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2011.

- Nanthan B.M., Moran A. (2008). Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes obes.* 15(1): p21-29.
- Bueno, A.A., Habitante, C.A., Oyama, L.M. et al. (2011). White adipose tissue re-growth after partial lipectomy in high fat diet induced obese Wistar rats. *J Physiol Sci.* 61: p55-63.
- Paolillo, F. R., J. C. Milan, et al. (2011a) Effects of Infrared-LED Illumination Applied During High-Intensity Treadmill Training in Postmenopausal Women. *Photomed Laser Surg* 29(9): 639-645.
- Paolillo, F.R. Corazza, A. Borghi-Silva, A. Parizotto, N.A. et al. (2012). Infrared LED irradiation applied during high-intensity treadmill training improves maximal exercise tolerance in postmenopausal women: a 6-month longitudinal study. *Lasers in Medical Sci.*
- Paolillo, F. R.(2011b). Efeitos da iluminação-LED (850nm) associada ao treinamento em esteira ergométrica em mulheres na pós-menopausa. (Tese). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos197p.
- Robinson A.M., Willianson, S.A. et al. (1978). Controlo f glucose metabolism in isoletd acini of the lactating mammary gland of the rat. Effects of oleate on glucose utilization and lipogenesis. *Biochem J.* 170(3): p609-613.
- Rodríguez A., Catálan V., Gómez-Ambrosi, J. et al. (2007). Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des.* 13(21). P2169-2175.
- Ruby, B. C.; R. A. Robergs. (1994) Gender Differences in Substrate Utilization during Exercise. *Sports Medicine* 17(6): 393-410.
- Seidell J.C.(2000) Obesity, insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic. *Britith Journal of Nutrition.* 8(1): p5-8.
- Sene-Fiorese, M. et. al;(2008). Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity.* 16(10): P.1-6.
- Svanberg S (2002) Tissue diagnostics using lasers. In: Waynant RW (ed) *Lasers in medicine.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp 135–169.
- Tock, L., W. L. Prado, et al. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease decrease in obese adolescents after multidisciplinary therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 18(12): 1241-1245.

Trayhurn P., Bing C., Wood, S. (2006). Adipose tissue and adipokines – energy regulation from the human perspective. *J. Nutr.* 136. P1935S – 1939S.

Vieria, W.H.B. (2004). Efeitos do laser de baixa intensidade em 780µm sobre a performance muscular aeróbia de ratos em treinamento físico em esteira. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia), Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 81p.

Vladimov, Y.A., Osipov, A.N., Klebanov, G.I. (2004). Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry.*69: p81-90.

Whitehead, J.R. (2002). *Sports Medicine Bulletin*, 37(6): p5-6.

Zambon, L. et al. (2009). Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Revista de Nutrição*, 22(5): 707-715.

ANEXO 1

Tabela1. Valores de massa corporal inicial e massa corporal final.

Grupos	Massa Inicial	Massa Final
SP (8)	295,38±26,44	372,63±34,41
SPL (8)	305,13±16,70	402,14±28,48
EP (8)	331,75±10,24	411,63±10,90
EPL (8)	332,25±19,38	408,62±13,75
SH (8)	305,50±17,16	405,88±34,14
SHL (8)	307,25±19,02	408,12±39,30
EH (8)	329,25±22,76	426,75±38,40
EHL (8)	332,38±19,88	401,25±16,70

Não houve diferença significativa. Unidade de medida em gramas (g).

ANEXO 2

Tabela 2. Valores de delta de massa corporal.

Grupos	Delta
SP (8)	26,15±6,6
SPL (8)	31,80±5,5
EP (8)	23,60±3
EPL (8)	20,72±3,7
SH (8)	32,86±7,5
SHL (8)	32,83±9,5
EH (8)	32,99±5,7
EHL (8)	22,99±1,8

Houve diferença significativa entre EH x EHL para $p < 0.001$. Unidade de medida em percentual (%).

ANEXO 3

Tabela 12. Análise Bioquímica

	Colesterol Total	Triglicerídeos	LDL	HDL
SP	114,9±7,9	89,5±3,4	143,7±12	51,4±6,4
SPL	113,5±9,8	86,9±10	154,9±12	52,7±18
EP	40,7±8,9 ^b	64,7±4,6 ^a	56,7±12 ^a	28,9±8,4 ^a
EPL	41,9±6,5 ^c	47,6±6,6 ^b	53,1±7,5 ^b	22,1±5,2 ^b
SH	205,3±19 ^d	120,1±22 ^d	243,5±26,7 ^d	56,1±8,7
SHL	121,1±14 ^a	89,6±7,5 ^a	154,4±8 ^a	52,9±7,9
EH	57,5±10 ^b	63,1±9,8	84,2±18 ^{a, d}	39±8,7 ^a
EHL	35,4±8 ^c	41,6±7 ^{b, c}	62,7±9,7 ^b	35,6±7,2 ^b

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).

ANEXO 4

Área de adipócitos

	EPI	RET	VIS
SP	11367±4020	11387±4025	4807±1365
SPL	16472±5304 ^a	16499±5315 ^a	6364±2081 ^a
EP	10086±3513 ^a	10104±3519 ^a	4926±1598
EPL	9733±2891 ^b	9748±2895 ^b	4504±998 ^{b, c}
SH	15500±3776 ^d	14386±4529 ^d	8540±2376 ^d
SHL	15846±4795 ^d	16143±5040 ^{a, d}	5937±1582 ^{a, d}
EH	11003±3089 ^{a, d}	14983±4205 ^d	6070±1677 ^{a, d}
EHL	7913±2210 ^{b, c, d}	13473±4453 ^{b, c, d}	5797±1732 ^{c, d}

Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença significativa para $p < 0.001$ entre as comparações dos animais alimentados com a mesma dieta (diferentes subscritos onde, a x S, b x SL e c x E) e a comparação do mesmo tratamento entre diferentes dietas (subscrito d).