

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Mauro Célio Ribeiro Silva

Avaliação dos efeitos do *Light Emitting Diode* (LED) de baixa intensidade no tecido adiposo branco e marrom de camundongos obesos

Montes Claros

2022

Mauro Célio Ribeiro Silva

Avaliação dos efeitos do *Light Emitting Diode* (LED) de baixa intensidade no tecido adiposo branco e marrom de camundongos obesos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde (PPGAS) da Universidade Federal de Minas Gerais como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade

Montes Claros

2022

S586a Silva, Mauro Célio Ribeiro.
2022

Avaliação dos efeitos do light emitting diode (led) de baixa intensidade no tecido adiposo branco e marrom de camundongos obesos [manuscrito] / Mauro Célio Ribeiro Silva. Montes Claros, 2022.

49 f.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: André Luiz Sena Guimarães.

Banca examinadora: Alanna Fernandes Paraíso, Igor Viana Brandi, João Marcus Oliveira Andrade.

Inclui referências: f. 33-36; 46-49.

1. Fototerapia. 2. Obesidade. 3. Tecido Adiposo marrom. I. Guimarães, André Luiz Sena. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU:613.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Reitor(a): Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-reitor(a): Alessandro Fernando Moreira

Pró-reitor(a) de Pesquisa: Mário Fernando Montenegro Campos

Pró-reitor(a) de Pós-Graduação: Fábio Alves da Silva Júnior

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE

- Coordenador(a): Sérgio Henrique Souza Santos - UFMG

- Subcoordenador(a): Bruna Mara Aparecida de Carvalho Mesquita - UFV

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALUNO: MAURO CÉLIO RIBEIRO SILVA

TÍTULO DO ESTUDO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO *LIGHT EMITTING DIODE* (LED) DE BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO E MARROM DE CAMUNDONGOS OBESOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTOS E SAÚDE, como requisito para obtenção de grau de MESTRE EM ALIMENTOS E SAÚDE.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Igor Viana Brandi – UFMG

Prof(a). Dr(a). Alanna Fernandes Paraíso – UFJF

Prof(a). Dr(a). João Marcus Oliveira Andrade (Coorientador) – Unimontes

Prof(a). Dr(a). André Luiz Sena Guimarães – Orientador/Presidente

Montes Claros, 25 de fevereiro de 2022.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Agrárias

Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 25 dias do mês de fevereiro de 2022, às 7:30 horas, sob a Presidência do Professor André Luiz Sena Guimarães, Dr. Sc. (Orientador – Unimontes) e com a participação dos Professores João Marcus Oliveira Andrade, Dr. Sc. (Coorientador - Unimontes), Alanna Fernandes Paraíso, Dr. Sc. (UFJF) e Igor Viana Brandi, Dr. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação do Discente **MAURO CÉLIO RIBEIRO SILVA**, aluno do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Avaliação dos efeitos do Light Emitting Diode (LED) de baixa intensidade no tecido adiposo branco e marrom de camundongos com obesidade induzida por dieta", sendo o aluno considerado APROVADO. E, para constar, eu, Professor André Luiz Sena Guimarães, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da banca examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Igor Viana Brandi, Professor do Magistério Superior**, em 10/03/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luiz Sena Guimaraes, Usuário Externo**, em 14/03/2022, às 09:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alanna Fernandes Paraíso, Usuário Externo**, em 14/03/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Marcus Oliveira Andrade, Usuário Externo**, em 15/03/2022, às 06:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1296349** e o código CRC **918038E3**.

Dedico este trabalho a toda minha família e amigos queridos, por todo o carinho, apoio e atenção. As minhas vitórias são mais do que minhas, são nossas!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me guiar, encorajar e por não ter me deixado desistir diante dos desafios da vida de mestrando, que em meio a uma pandemia global, tornou-se tudo mais difícil, mas possível graças a Ele.

A Nossa Senhora por me ensinar as virtudes da paciência, esperança e humildade para lidar com todos os aprendizados e lições que tive nesse tempo.

A minha sobrinha Maria Helena, meu anjinho, por todo amor, carinho e alegria diária.

Ao meu orientador André Luiz Guimarães por ter confiado no meu trabalho e pela oportunidade de crescimento e aprendizagem.

Ao meu coorientador João Marcus, pela paciência, confiança, aprendizado na minha trajetória e me desafia e me motiva a ir sempre mais longe. Aprendo muito com você. Você é uma grande inspiração para mim.

Aos colegas de pesquisa da UFMG e UNIMONTES, vocês são a melhor equipe de pesquisa que existe. Obrigado por todo suporte e conhecimento compartilhado.

Enfim, a todos os amigos, irmãos do Grupo Católico DDD (Doidin de Deus), familiares, profissionais e professores que contribuíram, de alguma forma nesta caminhada, meus sinceros agradecimentos!

"Não há nada mais gratificante do que dirigir a própria vida. Nossas atitudes escrevem nosso destino. Nós somos responsáveis pela vida que temos... A aprendizagem é nossa e ninguém poderá fazê-la por nós, assim como nós não poderemos fazer pelos outros. Quanto mais depressa aprendermos isso, menos sofreremos."

Zibia Gasparetto

RESUMO

A obesidade emerge com um dos mais relevantes problemas de saúde pública no mundo. É uma doença de etiologia multifatorial, envolvendo fatores genéticos, epigenético e sobretudo, ambientais, sendo caracterizada pelo aumento do peso e/ou adiposidade corporal. A proposição de estratégias de prevenção, controle e tratamento da obesidade são urgentes e úteis para minimizar os impactos desta doença sobre a qualidade de vida do indivíduo e serviços de saúde. A utilização de terapias de fotobiomodulação emerge como um promissor campo em diversas doenças. No contexto da obesidade, ainda tem-se poucas evidências do papel desta técnica, especialmente usando o *Light-Emitting Diode* (LED). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da irradiação com LED sobre a expressão de marcadores associados à termogênese e lipogênese no tecido adiposo marrom e branco, respectivamente, e sobre parâmetros corporais, metabólicos e histológicos em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperglicídica. Experimento realizado com 24 camundongos randomizados em quatro grupos: *i*) grupo controle (ST) alimentado com dieta padrão e sem exposição ao LED; *ii*) grupo (HCD) alimentado com dieta hiperglicídica e sem exposição ao LED; *iii*) grupo (LED+I) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado com LED na região dorsal (interescapular); *iv*) grupo (LED+A) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado com LED na região abdominal. A primeira fase do estudo compreendeu a indução da obesidade por 12 semanas; em seguida, os animais dos grupos LED+I e LED+A foram submetidos a sessões de irradiação com LED nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21. Foram mensurados parâmetros corporais, bioquímicos e histológicos, além da expressão de marcadores associados à termogênese e à lipogênese no tecido adiposo pela técnica de qRT-PCR. Os resultados apontam para o aumento na variação de peso corporal (peso corporal final subtraído pelo peso inicial) entre os grupos HCD e LED+A. Ademais, observou-se redução de 33,3% e 23,8% no peso do tecido adiposo epididimal e de 25% e 10,7% na adiposidade visceral nos grupos LED+I e LED+A em relação ao grupo HCD, respectivamente, mas sem associação estatisticamente significativa, considerando-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$. Avaliação histológica qualitativa do tecido adiposo epididimal e marrom, indicou menor acúmulo de gotículas de gordura nos grupos tratados em relação ao grupo HCD. Por fim, o LED causou aumento dos níveis de expressão de mRNA para proteína desacopladora (*uncoupling protein 1* - *UCP1*) no tecido adiposo marrom e diminuição da proteína sintase de ácidos graxos (*fatty acid synthase* - *FAS*) no tecido adiposo epididimal. Em conjunto, os achados do presente estudo sugerem que o LED por induz melhoras de parâmetros corporais possivelmente associados à alterações histológicas e modulação de marcadores associados à termogênese e lipogênese do tecido adiposo branco e marrom, respectivamente.

Palavras-chave: Fototerapia. Obesidade. Tecido Adiposo. Termogênese. Lipogênese.

ABSTRACT

Obesity is one of the most relevant public health problems worldwide. It is a multifactorial disease that involves genetic, epigenetic, and environmental factors, being characterized by increased weight and/or body adiposity. The proposition of prevention, control and treatment strategies for obesity are urgent and necessary to minimize this disease's impacts on the individual's quality of life and health services. The use of photobiomodulation therapies arises as a promising field for diverse diseases. In the obesity context, however, little evidence on this technique's role is given, especially using a Light-Emitting Diode (LED). Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of LED irradiation on the expression of thermogenesis and lipogenesis-associated markers in the brown and white adipose tissue, respectively, and on the body, metabolic and histological parameters in mice with obesity induced by a hyperglycemic diet. The experiment was performed with 24 mice divided into four groups: *i*) standard group (ST) fed with hyperglycemic diet; *ii*) HCD group fed with hyperglycemic diet; *iii*) LED+I group fed with hyperglycemic diet and exposed to LED irradiation in the dorsal region (interscapular); *iv*) LED+A group fed with hyperglycemic diet and exposed to LED irradiation in the abdominal region. The first phase of the study comprehended the induction of obesity for 12 weeks. Next, the animals of the LED+I and LED+A groups were submitted to LED irradiation sections on the following days: 1, 3, 7, 10, 14, and 21. Body, biochemical and histological parameters, along with the expression thermogenesis and lipogenesis-associated markers were assessed in the adipose tissue via qRT-PCR. The main findings pointed to an increased body weight variation (final body weight minus initial body weight) between the HCD and LED+A groups. Furthermore, it was observed a 33.3% and 23.8% reduction in the epididymal adipose tissue weight, and 25% and 10.7% in the visceral adiposity in the LED+I and LED+A groups, respectively, as compared to HCD, although without statistically significant association as established by the p-value cutoff set as < 0.05 . The qualitative histological evaluation of the epididymal and brown adipose tissue pointed to decreased accumulation of fat droplets in the treated groups as compared to HCD. Finally, the LED exposition was associated with an increased mRNA expression of the uncoupling protein 1 – UCP1 in the brown adipose tissue and decreased fatty acid synthase – FAS in the epididymal adipose tissue. Altogether, these findings suggest that the LED treatment promoted improvements in the body parameters, which is possibly associated with the histological alterations and thermogenesis and lipogenesis markers expression modulation in the white and brown adipose tissue, respectively.

Keywords: Phototherapy. Obesity. Adipose tissue. thermogenesis. lipogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
4 PRODUTOS	19
4.1 Artigo 1:	20
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48

INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (1), sendo considerado um dos mais sérios problemas de saúde pública em todo o mundo, dada a sua crescente prevalência e sua relação com uma série de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, doença hepática gordurosa não-alcoólica e vários tipos de cânceres. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que entre 1975 a 2016, o número de pessoas com obesidade no mundo triplicou. Sendo que, em 2016, 1,9 bilhão dos adultos apresentaram sobrepeso ou obesidade (2,3,4).

No Brasil, a obesidade aumentou 67,8% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018 (5). De acordo com o Ministério Público (MS), a população adulta representou aproximadamente 8 milhões de indivíduos com excesso de peso e 3,6 milhões com obesidade, em 2019 (6). O aumento da prevalência da obesidade impacta significativamente nos serviços de saúde, favorecendo o aumento de outras condições crônicas, incrementando gastos com serviços de saúde e afetando a cadeia de produtividade, devido anos de vida perdidos e gastos com seguridade social (7).

A obesidade é um distúrbio metabólico caracterizado por um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, culminando em acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo branco e em outros tecidos e órgãos como o fígado, coração, rins e músculo esquelético (depósitos ectópicos de gordura) (8). É determinada pela interação entre os fatores individuais (genéticos e epigenéticos) e comportamentais, especialmente, o sedentarismo e dieta ricas em calorias. O acúmulo de gordura no tecido adiposo, caracterizado por hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, produz importantes alterações metabólicas/imunológicas, levando ao quadro de inflamação crônica de baixo grau, que favorece o desenvolvimento da resistência à insulina, dislipidemias e hipertensão arterial, definido em conjunto, como síndrome metabólica (9,10).

O tecido adiposo é o principal sítio envolvido nos mecanismos fisiopatológicos da obesidade. Segundo características embrionárias, morfológicas e funcionais, é dividido em, pelo menos dois subtipos, a saber: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) (11). O TAB representa a maior parte do tecido adiposo no organismo e é responsável pelo armazenamento de triacilgliceróis (reserva energética), isolamento térmico, proteção contra

choques mecânicos e, especialmente pela produção, liberação e ação, local e sistêmica, de adipocinas que exercem diversos efeitos moleculares (12,13,14). Por outro lado, o TAM está relacionado com a termogênese, apresentando alta densidade mitocondrial e exercendo importante papel no processo de gasto energético (15,16). O tecido adiposo pode representar até 25% da massa corporal em indivíduos adultos magros, importante fonte de regulação dos processos energéticos em nosso corpo e possui distribuição corporal variável de acordo com idade, sexo e outras características bióticas (Figura 1) (17).

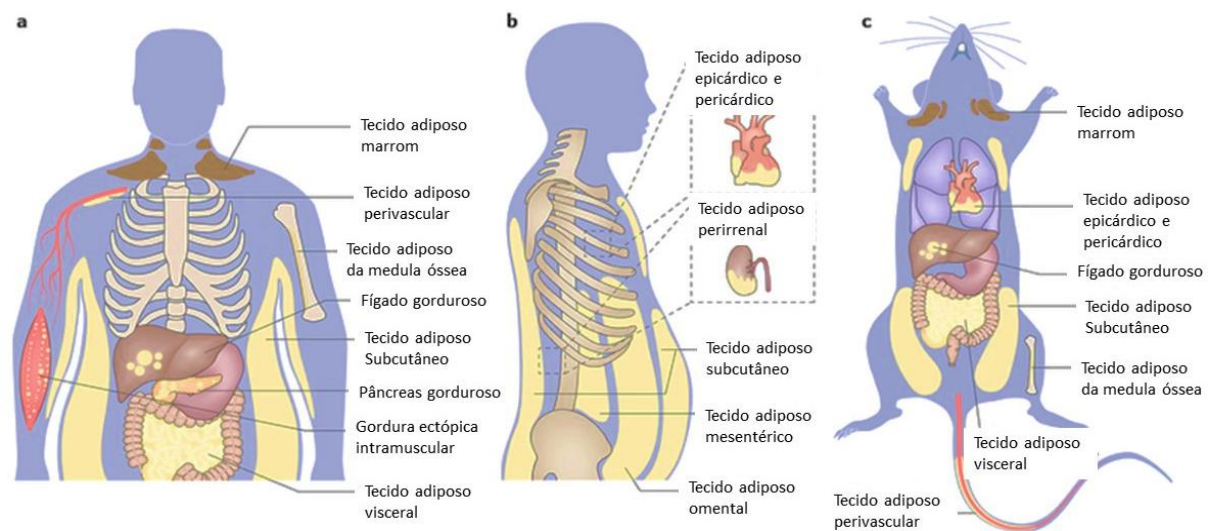


Fig. 1 | Principais depósitos de tecido adiposo e suas localizações anatômicas em humanos adultos e camundongos. Existem dois tipos principais de tecido adiposo, tecido adiposo branco rico em lipídios (TAB; responsável pelo armazenamento de energia) e tecido adiposo marrom rico em mitocôndrias (TAM; responsável pela queima de energia). Adipócitos de TAM e TAB emergem de linhagens celulares distintas; no entanto, o TAB, especialmente o subcutâneo, pode se converter em gordura metabolicamente ativa através do processo de escurecimento (*browning*). O TAB é encontrado em muitas localizações anatômicas. Os maiores depósitos são subcutâneos (sob a pele; por exemplo, inguinal, glúteo e femoral) e viscerais (dentro da cavidade abdominal, entre os órgãos; por exemplo, omental, mesentérico e epicárdico). Depósitos de TAB menores são encontrados ao redor dos vasos sanguíneos (perivascular, que regulam o tônus vascular), na medula óssea (que regulam a remodelação óssea) ou como depósitos ectópicos em órgãos específicos (por exemplo, doença hepática gordurosa não alcoólica, pâncreas gorduroso ou gordura intramuscular). Esses depósitos adiposos possuem características moleculares únicas; portanto, a distribuição do peso tem importantes consequências biológicas. Por exemplo, a maioria dos adipócitos viscerais tem densidade mitocondrial ligeiramente maior, são mais lipolíticos, são menos sensíveis à insulina, produzem menos leptina e contribuem com mais ácidos graxos livres circulantes em comparação aos adipócitos subcutâneos e, portanto, têm uma associação mais forte com a síndrome metabólica. O TAM está presente em quantidade bem menor que o TAB. Localiza-se sobretudo nas regiões cervical e supraclavicular em humanos e interescapular nos camundongos. Devido sua alta densidade de mitocôndrias e expressão de proteína desacopladoras, como a UCPI, é vital para o processo de termogênese. A parte **a** descreve a distribuição geral de gordura em humanos de uma vista frontal e a parte **b** descreve os tipos de depósitos de gordura visceral de uma vista lateral. A parte **c** descreve a distribuição geral de gordura em camundongos de uma visão supina. Adaptado de Quail e Dannenberg (18).

O TAB é o principal reservatório energético corporal, acumulando no citoplasma dos adipócitos uma grande quantidade de triacilglicerol. Essas células através de respostas bioquímicas específicas são capazes de estocar triacilglicerol, especialmente em períodos de abundância energética (lipogênese) e de mobilizá-los para degradação e geração energética em situações de déficit calórico (lipólise) (13). O TAB possui intensa atividade endócrina e parácrina, sendo seu fenótipo de expressão fortemente influenciado pelo acúmulo de gordura. Mais de 600 adipocinas são secretadas pelo TAB, influenciando a homeostase lipídica e glicêmica, modulando o apetite, a microbiota intestinal, a resposta imunológica (15). No contexto da obesidade, a disfunção do TAB predispõe outras comorbidades, como o diabetes (aumento da resistência à insulina), a doença hepática gordurosa não-alcoólica, dislipidemias e doenças cérebro-cardiovasculares, como acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio (19,20,21). A Figura 2 ilustra as alterações imunológicas no TAB em decorrência da obesidade.

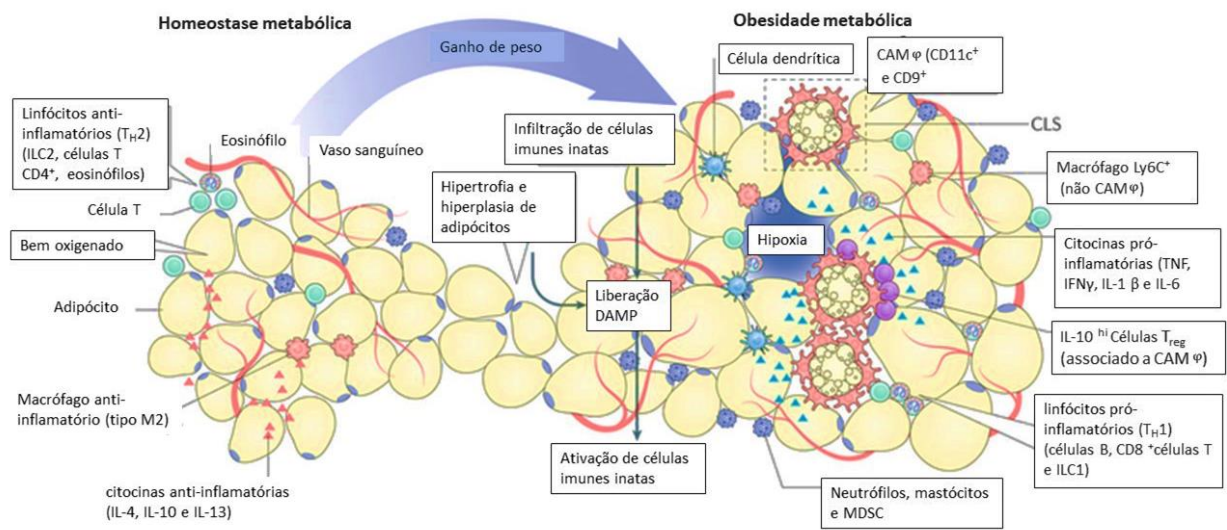


Fig. 2 | Evolução do microambiente do tecido adiposo na progressão da obesidade. Em condições de peso corporal saudável (homeostase metabólica), o microambiente do tecido adiposo é bem vascularizado e rico em citocinas anti-inflamatórias (como IL-4, IL-10 e IL-13) e, como consequência, hospeda uma variedade de células imunes, incluindo macrófagos M2, células linfoides inatas do tipo 2, células T auxiliares (T_H2) e eosinófilos produtores de IL-4. Em resposta ao ganho de peso corporal ou obesidade, os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia; à medida que o suprimento vascular se torna limitado, essas células entram em injúria e apoptose. Isso libera padrões moleculares associados a danos (DAMP) no microambiente, que desencadeiam a infiltração e ativação de células imunes inatas (por exemplo, células dendríticas, macrófagos e granulócitos). Esses efeitos promovem o desenvolvimento de estruturas semelhantes à coroa (CLS) e respostas imunes tipo 1 (pró-inflamatórias). Essa resposta inclui acúmulo de citocinas do tipo 1 (por exemplo, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1 β e IL-6) e células imunes pró-inflamatórias, incluindo vários granulócitos, células linfoides inatas do tipo 1, células B e células T $CD8^+$, que perpetuam respostas inflamatórias crônicas. Os macrófagos são altamente diversos dentro do tecido adiposo hipertrófico/hiperplásico; aqueles associados à CLS (macrófago associado à CLS, $CAM\phi$) proliferam e expressam os marcadores de superfície celular $CD11c$ e $CD9$, enquanto aqueles que estão mais distantes (não- $CAM\phi$) expressam o antígeno linfocitário 6C ($Ly6C$). Essas alterações inflamatórias coincidem com fibrose crônica e inflamação vascular, que se alimentam para sustentar um processo de inflamação contínuo,

que mantém-se localmente, que libera produtos na corrente sanguínea, interferindo na dinâmica de outros órgãos/tecidos. Adaptado de Quail e Dannenberg (18).

Diferente do TAB, o tecido adiposo marrom é rico em mitocondriais, possui vasculatura e inervação densas e possui seu citoplasma repleto de pequenas gotículas multiloculares de gordura. É o principal local de realização da termogênese sem tremores em mamíferos. Os adipócitos marrons possuem alta capacidade oxidativa e possuem alta concentração da proteína desacopladora (UCP1) na membrana interna das mitocôndrias (15). A UCP1 desacopla a cadeia respiratória no processo de fosforilação oxidativa, produzindo uma alta taxa de oxidação e permitindo que a célula use energia metabólica para gerar calor, deste modo, regula a temperatura corporal e aumenta o gasto energético, assim permitindo ao organismo proteção contra o frio e a obesidade (22,11). Ademais, ao contrário do conceito predominante de que a presença e função do TAM serão restritas a humanos, apenas a neonatos e lactentes, estudos diversos indicam para a presença anatômica e funcional deste tecido em humanos adultos. Sabe-se ainda, que muitos fatores ambientais podem modular o TAM, como a exposição ao frio, drogas adrenérgicas, dieta e exercício físico (23,24,25).

O TAM ainda, estabelece diversos mecanismos de interação com outros órgãos/tecidos, influenciando inúmeros processos biológicos, sobretudo metabólicos. Análoga à visão anteriormente sustentada pela literatura de que o TAB era simplesmente um órgão de armazenamento de energia, está se tornando cada vez mais evidente que o TAM não funciona isoladamente apenas para dissipar energia química como calor. Em vez disso, demonstrou interagir extensivamente com outros tecidos por meio de vias neurais e endócrinas tanto na saúde quanto na doença (26). A Figura 3 ilustra, de forma resumida essa interação.

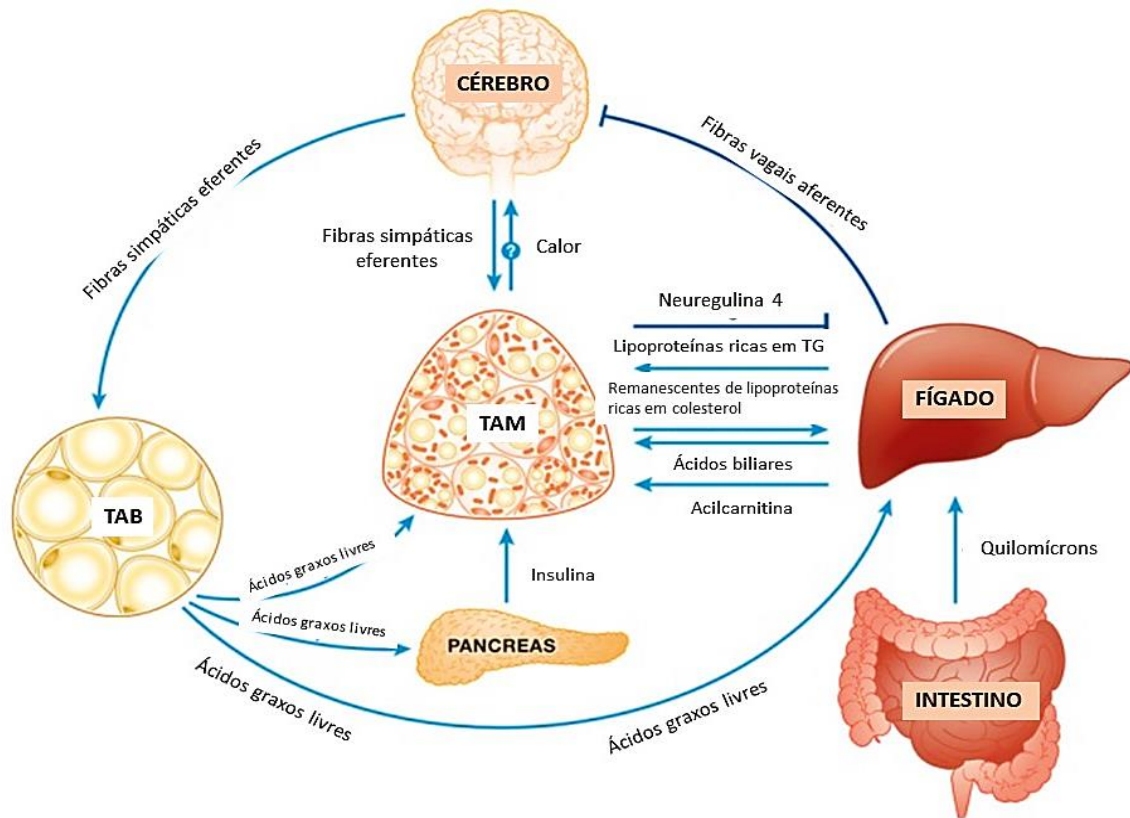


Fig. 3 | Interação entre o tecido adiposo marrom e outros órgãos. Durante o período pós uma refeição rica em gordura, o colesterol na forma de quilomícrons é entregue primeiro ao fígado e depois na forma de lipoproteínas ricas em triglicerídeos para o TAM. Os remanescentes de lipoproteínas ricas em colesterol são então liberados pela ação da lipoproteína lipase e, por sua vez, são entregues pela corrente sanguínea de volta ao fígado, onde os hepatócitos convertem o colesterol em ácidos biliares. Esses ácidos biliares circulantes derivados do colesterol da dieta retornam então ao TAM para promover a termogênese. Também pode haver uma linha de comunicação do TAM com o cérebro durante a alimentação, devido às propriedades de detecção de calor dos neurônios hipotalâmicos. Durante o consumo crônico de uma dieta rica em carboidratos, o aumento da atividade da glicosequinase no fígado, resulta na ativação de neurônios aferentes vagais que inibem aqueles eferentes simpáticos no TAM, resultando em diminuição da termogênese naqueles suscetíveis ao ganho de peso. Da mesma forma, durante o envelhecimento, a diminuição da acilcarnitina liberada pelo fígado e produzida pelos ácidos graxos livres liberados durante a lipólise do TAB, resulta em diminuição da termogênese do TAM e intolerância ao frio. O próprio TAM libera neuregulina 4, que protege o fígado contra o acúmulo de gordura e a resistência à insulina associados ao consumo crônico de uma dieta rica em gordura. Os ácidos graxos liberados pela lipólise do TAB também promovem a liberação de insulina do pâncreas, o que causa a captação de glicose, ácidos graxos e lipoproteínas ricas em triglicerídeos pelo TAM para sustentar a termogênese. Essa imagem ressalta o fato de que o TAM pode regular diferentes funções fisiológicas independentemente da termogênese. Adaptado de (27) Hankir e Klingenspor.

O tratamento da obesidade é complexo e exige monitoramento prolongado e multiprofissional. Estratégias como dieta e atividade física são o cerne da diminuição do peso corporal. No entanto, tem-se buscado diversas estratégias complementares que otimizem a perda de peso. Nas últimas décadas tem crescido a utilização de terapias de fotobiomodulação (PBM) ou fotobioestimulação para aplicações médicas diversas, inclusive no campo da obesidade. O termo “fotobiomodulação” é empregado para distinguir características e mecanismos de ação

próprios. Os dispositivos de luz lasers (LASER) e diodos emissores de luz (LED) utilizados na prática clínica no tratamento de dores, cicatrização de feridas, estética possuem particularidades que inclui o comprimento de onda, potência e densidade de energia e capacidade da luz de penetrar no tecido possuem particularidades que inclui o comprimento de onda, potência e densidade de energia e capacidade da luz de penetrar no tecido. Especialmente os de ondas de luz vermelho de baixa energia, incluindo LEDs, emitem luz não ionizante, não-térmico que são capazes de produzir efeitos benéficos no local de aplicação (28).

A fototerapia utilizando o *Light Emitting Diode* (LED) pode representar uma opção terapêutica promissora devido ao seu potencial tratamento em diversas doenças. Os efeitos da luz começam quando uma molécula de cromóforo (responsável pela cor associada a compostos biológicos como hemoglobina e citocromos) é exposta a um comprimento de onda de luz, distância, frequência de tratamento e tempo da irradiação adequados. A enzima citocromo C oxidase é um cromóforo alvo comum para PBM pela capacidade de absorver luz infravermelho. A irradiação de LED emite fótons que são absorvidos por um cromóforo iniciando os efeitos fisiológicos terapêuticos do PBM através do aumento no transporte de elétrons, alterações no potencial de membrana mitocondrial, síntese de ácidos nucleicos, consumo de oxigênio e geração de ATP, NADH (29). A fototerapia com LED pode estimular e influenciar o mecanismo de proliferação e vários processos de sinalização celular, atuar na produção de citocinas, interleucinas e diversas macromoléculas (30).

Os dispositivos de LEDs possuem determinadas vantagens em sistemas de fototerapia, destacando-se a pouca utilização de eletricidade para produzir luz; são ativados sem a necessidade de filamentos ou lâmpadas de flash; possuem maior precisão em alvos específicos; atingem maior área a ser irradiada, de fácil manuseio e preço acessível. Além disso, a fototerapia com LED soma outros benefícios de uso e logística, pois pode ser aplicado por qualquer profissional treinado, segurança e conforto para o paciente devido ser indolor e sem efeitos colaterais, bem como é tolerado por pacientes de todas as idades (31).

Poucos estudos mostram a utilização de LED para fins de perda de peso e adiposidade corporal. Estudo russo mostrou que a realização de sessões diárias de LED por três semanas reduziu a gordura corporal e o apetite, em afetar o peso corporal (32). Em outro estudo, a combinação entre exercício físico e fototerapia por seis semanas, levou à diminuição da gordura corporal (33). Roche *et al.* mostraram que o uso da terapia com laser de baixa potência (*low-level laser*

therapy – LLLT) foi capaz de reduzir medidas de circunferência do quadril, cintura e abdome em indivíduos com IMC entre 30 e 40 Kg/m² (34). Corroborando, o tratamento com LLLT por seis semanas levou à diminuição média da circunferência abdominal em 5,4 polegadas (35). Em outro estudo utilizou-se um novo dispositivo de laser combinado de 1060 nm e 635 nm e mostrou reduções estatisticamente significativas na gordura abdominal e submentoniana em 18,62% e 26,4% (36). Em conjunto, observa-se que a utilização de terapias envolvendo a fotobiomodulação podem abrir uma importante perspectiva no contexto da obesidade, apesar dos estudos citados ainda apresentarem importantes limitações metodológicas.

Nesse contexto, o presente estudo levanta a seguinte questão norteadora: a) o LED é capaz de modular o tecido adiposo branco e marrom de camundongos com obesidade induzida por dieta, de modo a influenciar aspectos morfológicos e moleculares, e deste modo, contribuir para a perda de peso/acúmulo de gordura corporal e melhorar parâmetros laboratoriais?

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação com *Light-Emitting Diode* (LED) sobre a expressão de marcadores associados à termogênese e lipogênese no tecido adiposo marrom e branco, respectivamente, e sobre parâmetros corporais, metabólicos e histológicos em camundongos com obesidade.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da fotobiomodulação com LED sobre:
 1. Avaliar os efeitos da fotobiomodulação com LED sobre parâmetros de composição corporal ou gordura corporal e metabólicos;
 2. Analisar os efeitos da fotobiomodulação com LED sobre o perfil glicêmico e lipídico;
 3. Analisar os efeitos do tratamento com LED na termogênese no TAM;
 4. Analisar os efeitos do tratamento com LED na lipólise/lipogênese no TAM.

PRODUTOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS

Artigo 1: Fotobiomodulação com *Light-Emitting Diode* (LED) modula marcadores associados à termogênese e à lipogênese no tecido adiposo e promove melhora de parâmetros corporais em camundongos obesos; com intenção de submissão ao periódico *Lasers in Medical Sciences* (Fator de impacto: 3,1; Qualis CAPES: A2 na área interdisciplinar).

Artigo 1

Fotobiomodulação com *Light-Emitting Diode* (LED) modula marcadores associados à termogênese e à lipogênese no tecido adiposo e promove melhora de parâmetros corporais em camundongos obesos

Mauro Célio Ribeiro Silva¹, Lílian Betânia Reis Amaro², Angeliny Tamiarana Lima², Alice Crespo Ferreira⁵, Deborah de Farias Lelis², João Marcus Oliveira Andrade^{1,2,3}, André Luiz Sena Guimarães^{1,2,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Enfermagem. Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Departamento de Fisiopatologia. Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Curso de Graduação em Medicina. Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Avaliar os efeitos da irradiação com *Light-Emitting Diode* (LED) sobre a expressão de marcadores associados à termogênese e lipogênese no tecido adiposo marrom e branco, respectivamente, e sobre parâmetros corporais, metabólicos e histológicos em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperglicídica. Experimento realizado com 24 camundongos randomizados em quatro grupos: *i*) grupo controle (ST) alimentado com dieta padrão e sem exposição ao LED; *ii*) grupo (HCD) alimentado com dieta hiperglicídica e sem exposição ao LED; *iii*) grupo (LED+I) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado com LED na região dorsal (interescapular); *iv*) grupo (LED+A) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado com LED na região abdominal; a primeira fase do estudo compreendeu a indução da obesidade por 12 semanas; em seguida, os animais dos grupos LED+I e LED+A foram submetidos a sessões de irradiação com LED nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21. Foram mensurados parâmetros corporais, bioquímicos e histológicos, além da expressão de marcadores associados à termogênese e à lipogênese no tecido adiposo pela técnica de qRT-PCR. Os resultados apontam para o aumento na variação de peso corporal (peso corporal final – inicial) entre os grupos HCD e LED+A. Ademais, observou-se redução de 33,3% e 23,8% no peso do tecido adiposo epididimal e de 25% e 10,7% na adiposidade visceral nos grupos LED+I e LED+A em relação ao grupo HCD, respectivamente, mas sem associação estatisticamente significativa. Avaliação histológica qualitativa do tecido adiposo epididimal e marrom, indicou menor acúmulo de gotículas de gordura nos grupos experimentais em relação ao grupo HCD. Por fim, o LED causou aumento dos níveis de expressão de mRNA para UCP1 no tecido adiposo marrom e diminuição de FAS no tecido adiposo epididimal. Em conjunto, os achados do presente estudo sugerem que o LED por induzir melhora de parâmetros corporais possivelmente associados à alterações histológicas e modulação de marcadores associados à termogênese e lipogênese do tecido adiposo branco e marrom, respectivamente.

Palavras-chave: *Light-Emitting Diode*. Obesidade. Tecido Adiposo Marrom. Tecido Adiposo Branco. Termogênese. Lipogênese.

ABSTRACT

To evaluate the effects of Light-Emitting Diode (LED) irradiation on the expression of thermogenesis and lipogenesis-associated markers in the brown and white adipose tissues, respectively, and on the body, metabolic and histological parameters of mice with obesity induced by hyperglycemic diet. The experiment was performed with 24 mice divided into four groups: *i*) standard group (ST) fed with hyperglycemic diet; *ii*) HCD group fed with hyperglycemic diet; *iii*) LED+I group fed with hyperglycemic diet and exposed to LED irradiation in the dorsal region (interscapular); *iv*) LED+A group fed with hyperglycemic diet and exposed to LED irradiation in the abdominal region. The first phase of the study comprehended the induction of obesity for 12 weeks. Next, the animals of the LED+I and LED+A groups were submitted to LED irradiation sections on the following days: 1, 3, 7, 10, 14, and 21. Body, biochemical and histological parameters, along with the expression thermogenesis and lipogenesis-associated markers were assessed in the adipose tissue via qRT-PCR. The main findings pointed to an increased body weight variation (final body weight minus initial body weight) between the HCD and LED+A groups. Furthermore, it was observed a 33.3% and 23.8% reduction in the epididymal adipose tissue weight, and 25% and 10.7% in the visceral adiposity in the LED+I and LED+A groups, respectively, as compared to HCD, although without statistically significant association. The qualitative histological evaluation of the epididymal and brown adipose tissue pointed to decreased accumulation of fat droplets in the treated groups as compared to HCD. Finally, the LED exposition was associated with an increased mRNA expression of UCP1 in the brown adipose tissue and decreased FAS in the epididymal adipose tissue. Altogether, these findings suggest that the LED treatment promoted improvements in the body parameters, which is possibly associated with the histological alterations and thermogenesis and lipogenesis markers expression modulation in the white and brown adipose tissue, respectively. brown adipose tissue, respectively.

Keywords: Light-Emitting Diode. Obesity. Brown adipose tissue. White adipose tissue thermogenesis. lipogenesis.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (1), sendo considerado um dos mais sérios problemas de saúde pública em todo o mundo, dada a sua crescente prevalência e sua relação com uma série de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, doença hepática gordurosa não-alcoólica e alguns tipos de cânceres (2-3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que entre 1975 a 2014, o número de pessoas com obesidade no mundo quase triplicou, passando de 3,2% para 10,8% entre homens e de 6,4% para 14,9% entre mulheres (4). É uma doença multifatorial, envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (como o sedentarismo e o consumo de dietas hipercalóricas) (5).

O tecido adiposo é o principal sítio envolvido nos mecanismos fisiopatológicas da obesidade (6,7). Segundo características embrionárias, morfológicas e funcionais, é dividido em, pelo menos dois subtipos: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (8). Ambos os tecidos adiposos regulam diversos mecanismos moleculares e bioquímicos associados à obesidade. Por exemplo, o incremento da atividade lipogênica do TAB pode favorecer o processo inflamatório tecidual por meio do aumento da produção e liberação de citocinas próinflamatórias por este tecido, favorecendo a gênese de diversas doenças associadas à obesidade (9,7). Ademais, estratégias de visam aumentar a resposta termogênica do TAM, seja estimulando a biogênese mitocondrial, a adipogênese do adipócito marrom e o processo de *browning*, emergem como fortes estratégias para a prevenção e tratamento da obesidade (10,11).

Assim, a identificação de estratégias de modulação do tecido adiposo parece ser uma promissora linha de atuação para propor mecanismo de tratamento da obesidade. Nesse contexto, um recente campo de investigação científica envolve o uso de fotobiomodulação. A

irradiação por fotobiomodulação é uma forma de terapia luminosa que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo o *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (LASER) de baixa intensidade, *Light-Emitting Diode* (LED) e/ou luzes de banda larga, no espectro visível e infravermelho. O tratamento que envolve um processo não térmico provoca eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas e fisiológicas no local de aplicação, trata-se de uma técnica não invasiva, indolor, com baixo risco para o paciente e comumente, sem efeitos colaterais (12,13,14).

A utilização da fotobiomodulação tem evidenciado diversos benéficos efeitos, incluindo analgesia, modulação da inflamação e cicatrização (13,15,16). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos dessa técnica, especialmente com uso do LED, no tecido adiposo branco e marrom em modelo murino de obesidade induzida por dieta.

Diante deste contexto, o presente estudo busca avaliar os efeitos da irradiação com LED sobre a expressão de marcadores associados à termogênese e lipogênese no tecido adiposo marrom e branco, respectivamente, e sobre parâmetros corporais, metabólicos e histológicos em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperglicídica.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Desenho do estudo

O estudo foi conduzido com 24 camundongos machos da linhagem Swiss, com oito semanas de idade, provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) foram randomizados em quatro grupos: *i*) grupo controle (ST) alimentado com dieta padrão e sem exposição ao LED; *ii*) grupo (HCD) alimentado com dieta hiperglicídica e sem exposição ao LED; *iii*) grupo (LED+I) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado

com LED na região dorsal (interescapular); iv) grupo (LED+A) alimentado com dieta hiperglicídica e irradiado com LED na região abdominal. Os animais foram mantidos por uma semana em aclimatização; em seguida foram randomizados e submetidos à fase de indução de obesidade, que durou doze semanas; neste momento em diante, iniciaram as sessões de irradiação com LED por 21 dias (fase de tratamento) (veja tópico 2.3); por fim, foram realizados diversos testes e análises laboratoriais pré e pós sacrifício dos animais (Figura 1).

Os animais foram mantidos em gaiolas (41x34x18 cm), sob ciclo de luminosidade (claro-escuro) de 12/12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60\pm 5\%$, e baixo nível sonoro $<40\text{ dB}$, além de livre acesso à dieta e água. No experimento foi usada dieta padrão ração Labina® (grupo ST) composta 65,8% de carboidratos, 3,1% de gorduras e 31,1% de proteínas, contendo $4,0\text{ KcalKg}^{-1}$ e dieta hiperglicídica (HCD) composta por 45% de leite condensado, 10% de açúcar refinado e 45% da dieta padrão; a composição de macronutrientes é de 74,2% de carboidratos, 5,8% de gorduras e 20% de proteínas, contendo $4,4\text{ Kcal.Kg}^{-1}$. A HCD possui alto teor de carboidratos refinados (primariamente sacarose) quando comparada à dieta ST. Desse modo, tendo importantes propriedades de indução de ganho de gordura corporal e indução de alterações metabólicas (17,18).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal (CEEBEA) da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil (nº 200/2020).

2.2 Mensuração do peso corporal e do consumo alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram mensurados duas vezes por semana, em dias e horários fixos e previamente definidos (segunda-feira e quinta-feira, às 8:00), usando balança semi-analítica. Para o peso corporal foram registrados os valores por animal, em gramas, ao longo de todo o tempo do experimento, bem como as médias por grupo em cada

dia de mensuração. Em relação ao consumo alimentar em calorias, foi obtida a média por grupo, sendo corrigida pelo peso corporal e pelo intervalo de dias (consumo alimentar final – consumo alimentar inicial = x; x/animais por gaiola/número de dias = y; y/peso corporal médio do grupo no período de avaliação). Para o peso corporal e consumo alimentar, optou-se por apresentar os dados na fase de indução da obesidade e da fase de tratamento, separadamente.

2.3 Protocolo de irradiação com LED

Após uma semana de aclimatização, os animais foram submetidos ao protocolo de irradiação. Os camundongos dos grupos LED+I e LED+A foram submetidos a seis sessões de irradiação nos dias 1, 3, 7, 10, 14 e 21, usando LED ($\lambda = 660 \text{ nm}$, 6 sessões, 120 s por sessão, potência = 48,1 mW, fluência = 5,77 J/cm² e distância de 8 cm do animal (19). Os camundongos dos grupos ST e HCD foram manejados da mesma forma que os demais animais dos grupos experimentais, exceto pela exposição ao LED. Para os animais do grupo LED+A a irradiação foi realizada na região abdominal, de modo a atingir toda a área anatômica de localização do tecido adiposo epididimal. Para os animais do grupo LED+I, a irradiação focou-se na região dorsal (interescapular), local de maior volume de tecido adiposo marrom em camundongos. Anteriormente às sessões, os animais tiveram as áreas de exposição tricotizadas; em seguida, os animais foram anestesiados usando Quetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (30 mg/Kg) (Ceva Santé Animale®, Brazil) via intraperitoneal; posteriormente foram devidamente posicionados em uma superfície rígida e posicionados para recebimento do LED. Atentou-se para a proteção mecânica ocular dos animais.

2.4 Ultrassonografia do tecido adiposo epididimal

As imagens de ultrassonografia da espessura do tecido adiposo epididimal dos camundongos foram obtidas na última semana da fase de indução de obesidade para comprovar as alterações da adiposidade corporal induzida pela dieta hiperglicídica. Para aquisição das imagens, os animais foram submetidos à tricotomização da região abdominal, posicionados em decúbito dorsal, imobilizados manualmente; usou-se o aparelho ultrassonográfico GE LOGIQe com transdutor de alta frequência L8-18i (GE Healthcare, EUA). Todas as imagens foram realizadas no modo de brilho fundamental (modo B), com otimização de ganho e as configurações de compensação de ganho de tempo foram mantidas constante ao longo do experimento.

2.5 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

O teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipTTG) foi realizado após jejum noturno de 12 horas, usando injeção intraperitoneal de glicose hipertônica a 50% peso/volume (Samtec®, Brasil) na dose de 2g/Kg de peso corporal. Foram obtidas amostras de sangue periférico através de pequeno corte na porção distal da cauda dos animais, em um volume estimado em 5-10µL por coleta, nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção para mensuração dos níveis de glicose, usando glicosímetro Accu-Chek (Roche Diagnostics®, USA).

O teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina (ipTSI) foi realizada pela manhã, com os animais em estado alimentado. Os animais receberam insulina 100UI/mL (Insulin N®, Novo Nordisk) na dose de 0,75UI/Kg de peso corporal, sendo mensurados os valores de glicose nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção. Os procedimentos de coleta e análise dos níveis de glicose foram semelhantes aos descritos para o ipTTG.

2.6 Eutanásia e análise da composição corporal

Após jejum noturno de 12 horas, os animais foram anestesiados usando Cloridrato de Ketamina 100mg/Kg e Xilazina 30mg/Kg por via intraperitoneal e em seguida, foram submetidos à eutanásia pela técnica de decapitação por guilhotina. Imediatamente após o sacrifício, foram obtidas amostras de sangue total e realizadas as coletas de tecido adiposo branco (epididimal, mesentérico e retroperitoneal) e marrom. O índice de adiposidade corporal (%) foi calculada a partir da fórmula: \sum peso dos tecidos epididimal, mesentérico e retroperitoneal (g)/peso do animal (g) x 100). O peso do tecido adiposo marrom foi corrigido pelo peso corporal do animal em gramas: peso do tecido adiposo marrom (g)/peso do animal(g).

2.7 Determinação de parâmetros bioquímicos

O soro foi obtido após centrifugação do sangue total a 3.200 rpm por 10 minutos e armazenado a -20°C até a realização das análises bioquímicas. Foram avaliados níveis de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, glicose e insulina usando kits específicos (In Vitro Diagnostica®, Brasil) e analisados no aparelho Humastar 200 (In Vitro Diagnostica®, Brasil). Os níveis de lipoproteína de alta densidade baixa densidade (LDL) foi calculado usada a fórmula proposta por Friedewald (20).

2.8 Análises histológicas

Após a eutanásia dos animais, um fragmento de tecido adiposo marrom e branco de cada animal foi lavado com solução salina e em seguida imerso em solução de formol 10%

tamponado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo e corados com hematoxilina & eosina (H&E). A visualização dos cortes e captação de imagens foram feitas em microscópio FSX100 *Inverted Microscope* (Olympus®, Japão).

2.9 Extração de RNA, retrotranscrição e qRT-PCR

O RNA total foi obtido a partir de 100 mg de tecido adiposo marrom e 200 mg de tecido adiposo epididimal, segundo o protocolo descrito pelo TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific®, United States). As concentrações de RNA foram determinadas em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm; e as amostras armazenadas a -80°C até o momento das análises seguintes. Para síntese do cDNA, inicialmente as amostras foram tratadas com DNase (Promega®, EUA), e em seguida realizada a retrotranscrição, utilizando o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 2000 ng de RNA para a síntese de cDNA, que foi armazenada a -20°C. Em seguida, procedeu-se com a mensuração do nível de expressão de mRNA de marcadores associados à termogênese, PRDM16 e UCP1 no tecido adiposo marrom e da lipólise/lipogênese, CPT-1, FAS e SREBP1c no tecido adiposo epididimal; foi utilizado o GAPDH como gene de padrão normalizador. Para as reações de qRT-PCR, foram usados SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen®, EUA), sendo realizadas na plataforma QuantStudio 6 Flex system (Applied Biosystems®, EUA). A relação da expressão gênica entre a amostra (gene alvo) e gene normalizador foi calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) (21).

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em médias±erro padrão da média (SEM) e analisados usando o programa estatísticos *GraphPad Prism* versão 7.0, sendo inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, comparações múltiplas foram realizadas usando *One-way* ANOVA teste seguido do pós-teste de Turkey. Para as análises dos testes ipGTT e ipIST foi usando o teste *Two-way* ANOVA. Consideraram-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Composição corporal e consumo alimentar

Ao analisar dos dados referentes ao período de indução de obesidade, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal (Fig.2A) e no consumo alimentar em Kcal (Fig.2C). No entanto, pode-se perceber aumento da espessura do tecido adiposo epididimal pelas medidas ultrassonográficas entre os grupos ST em comparação com aqueles alimentados com dieta hiperglicídica (Fig. 2B). Já na fase de tratamento, observou-se diminuição da diferença no peso corporal final – inicial entre os grupos HCD e LED+A (Fig.3A). Apesar de não observadas diferenças estatisticamente significativas no peso do tecido adiposo epididimal e na adiposidade visceral entre os grupos HCD, LED+I e LED+A (Fig.3B-C), ao analisar de forma pormenorizada os dados destas variáveis, pode-se perceber redução de 33,3% e 23,8% no peso do tecido adiposo epididimal e de 25% e 10,7% na adiposidade visceral nos grupos LED+I e LED+A em relação ao grupo HCD, respectivamente (dados não mostrados em gráficos). Esses dados corroboram com a avaliação histológica do tecido adiposo epididimal

e marrom, indicando à avaliação qualitativa, menor acúmulo de gotículas de gordura nos grupos experimentais em relação ao grupo HCD (Fig.3F-G). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para peso do tecido adiposo marrom (Fig.3D) e consumo alimentar em Kcal (Fig.3E).

3.2 Perfil metabólico

Os dados de avaliação metabólica dos perfis lipídico e glicêmico não indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HCD em relação aos LED+I e LED+A; no entanto, observou-se importantes diferenças estatísticas entre os grupos alimentados com diferentes dietas, onde que os animais do grupo ST apresentam melhores parâmetros (Fig.4A-H). Consideraram-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$.

3.3 qRT-PCR

Para avaliação dos efeitos do LED sobre genes da termogênese no tecido adiposo marrom e da lipólise/lipogênese no tecido epididimal foram realizadas análises de qRT-PCR. Foi observado aumento da expressão de UCP1, considerando-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$, no tecido adiposo marrom de animais do grupo LED+I em relação aos do grupo HGD (Fig.5A). Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a expressão de PRDM16 (Fig.5B). No tecido adiposo branco observou-se diminuição nos níveis de FAS no grupo LED+A em relação a HCD (Fig.5C). Não se obteve diferença estatisticamente

significativa na avaliação da expressão de CPT-1 e SREBP1c (Fig.5D-E) ao considerar-se significativas as comparações que obtiveram valores de $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O presente estudo possui caráter inovador ao mostrar em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperglicídica, que a aplicação de LED em região abdominal ou interescapular, foi capaz de alteração a composição corporal, possivelmente através da modulação da expressão de mRNA de UCP1 no tecido adiposo marrom e de FAS no tecido adiposo branco, indicando que a utilização do LED no contexto médico tem tornado mais frequente e com maior gama de aplicações, mas ainda emerge com um campo científico pouco explorado. O uso de LED na obesidade, pode ser mais uma estratégia complementar de controle e tratamento desta doença.

Em nossos resultados, pode-se observar que a aplicação do LED, apesar de não ter alteração no consumo alimentar, foi capaz de reduzir o peso corporal dos grupos LED+I e LED+A em relação ao grupo HCD. Poucos estudos mostram a utilização de LED para fins de perda de peso e adiposidade corporal. Pesquisa conduzida por Danilenko *et al.* mostrou que a realização de sessões diárias com a utilização de LED por três semanas foi capaz de reduzir a gordura corporal e o apetite, em afetar o peso corporal (22). Em outro estudo, a combinação entre exercício físico e fototerapia por seis semanas, levou à diminuição da gordura corporal (23). Roche *et al.* mostraram que o uso do LLLT foi capaz de reduzir medidas de circunferência do quadril, cintura e abdome em indivíduos com IMC entre 30 e 40 Kg/m^2 (24). Corroborando, o tratamento com LLLT por seis semanas levou à diminuição média da circunferência abdominal em 5,4 polegadas (25). Recente estudo que utilizou um novo dispositivo de laser combinado de 1060 nm e 635 nm mostrou reduções estatisticamente significativas na gordura

abdominal e submentoniana em 18,62% e 26,4% (26). Em conjunto, observa-se que a utilização de terapias envolvendo a fotobiomodulação podem abrir uma importante perspectiva no contexto da obesidade, apesar dos estudos citados ainda apresentarem importantes limitações metodológicas.

Em nosso estudo, foi capaz constatar que o LED modulou a expressão de UCP1 no tecido adiposo marrom e de FAS no tecido adiposo branco. Esses achados são inéditos e mostram, que apesar de não observadas alterações metabólicas nos perfis glicêmico e lipídico, o LED leva à modificações biomoleculares de marcadores que regulam importantes mecanismos metabólicos.

A proteína desacopladora 1 (UCP1) é expressa abundantemente em adipócitos marrons e bege, e tem sido extensivamente estudada por sua capacidade de elevar a termogênese, aumentar o dispêndio energético e reduzir o peso e a adiposidade corporais (27,11,10,28,29). Em nossa pesquisa, não reportamos trabalhos que avaliassem os efeitos do LED sobre o tecido adiposo marrom. Postulamos que o aumento da expressão de UCP1 no tecido adiposo marrom com exposição ao LED possa estar relacionado ao próprio mecanismo de ação da luz, que age sobre as mitocôndrias, aumentando sua atividade e proporcionando altos níveis de respiração celular e síntese de ATP (30). Uma característica morfológica marcante do tecido adiposo marrom é a alta densidade mitocondrial e mecanismos que atuem sobre essa organela, ainda que indiretamente, pode afetar o padrão de expressão molecular, incluindo da UCP1. Essa hipótese, poderia aumentar a atividade termogênica do tecido adiposo marrom, aumentando o gasto energético corporal e levando a alterações do peso e adiposidade corporais, que em última instância, afetariam o metabolismo do tecido adiposo branco.

Para o grupo LED+A, foi observado diminuição da expressão de mRNA para FAS, marcador envolvido no processo de lipogênese do tecido adiposo branco, indicando efeito modulador do LED também sobre o tecido adiposo branco. A lipogênese é um processo

bioquímico de síntese de triacilglicerol nos adipócitos brancos, sendo regulada por diversas proteínas e enzimas (31,32). O FAS tem um importante papel na regulação do peso corporal e na obesidade (33). Estudos demonstraram que a inibição do FAS em roedores induziu perda de peso e redução do consumo alimentar, sugerindo que este marcador pode regular o comportamento alimentar (34,35,36) e a homeostase energética.

Ademais, o uso de inibidor do FAS reduziu o consumo alimentar e aumentou a oxidação de ácidos graxos, levando a redução da gordura corporal e melhorando a esteatose hepática em camundongos com obesidade induzida por dieta (35). Ainda, a deleção do FAS em camundongos está associada à melhora da sensibilidade insulínica, redução do processo inflamatório no tecido adiposo e da esteatose hepática (33).

Corroborando com esse achado, estudo de Bluher *et al.* mostrou que a maior expressão de FAS no tecido adiposo omental de humanos esteve correlacionado com piora da sensibilidade insulínica, maior índice de massa corporal e disfunção do tecido adiposo (37). Em outro estudo com humanos, o aumento da expressão do gene FAS no tecido adiposo está ligado ao acúmulo de gordura visceral, diminuição da sensibilidade à insulina, aumento da insulina circulante de jejum, da IL-6 e da leptina, sugerindo um importante papel das vias lipogênicas na relação causal entre as consequências do excesso de ingestão energética e o desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 (38).

Em resumo, o presente estudo, apesar de suas limitações metodológicas, abre uma importante perspectiva na compreensão do papel do LED sobre aspectos moleculares no tecido adiposo. É tentador especular que a redução do peso e da adiposidade corporal associado aos resultados qualitativos de diminuição da deposição de gordura nos tecidos adiposos branco e marrom, resulta da modulação do FAS e do UCP1. Assim, o LED pode nos parecer uma promissora estratégia complementar na abordagem da obesidade.

REFERÊNCIAS

1. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, *et al.* Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Jun 15;3.
2. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Current obesity reports*. 2015 (4). 363–70.
3. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009 28;373(9669):1083-96. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4
4. Di Cesare M, Bentham J, Stevens GA, Zhou B, Danaei G, Lu Y *et al.* Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*. 2016 Apr 2;387(10026):1377-1396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)
5. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine*. 2017 Jan 19;376(3):254–66.
6. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue - Link to whole-body phenotypes. *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2015 (11). 90–100.
7. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2017 (13). 633–43.
8. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020 (7).
9. Reddy P, Lent-Schochet D, Ramakrishnan N, McLaughlin M, Jialal I. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V. 2019 (496). 35–44.

10. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, et al. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity*. 2011 Jan;19(1):13–6.
11. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*. 2013(19). 1252–63.
12. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. Mary Ann Liebert Inc.; 2015 (33). 183–4.
13. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *Journal of Biophotonics*. Wiley-VCH Verlag. 2016 (9). 1122–4.
14. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2016 May 1;22(3):348–64.
15. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *American Institute of Mathematical Sciences*; 2017(4). 337–61.
16. Minatel DG, Frade MAC, França SC, Enwemeka CS. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009; 41(6):433–41.
17. Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MC, Soriani FM, Pinho V, Faria AM, Santiago AF, Cara DC, Souza DG, Teixeira MM, Ferreira AV. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(9):E396-406. doi: 10.1002/oby.20230.
18. Menezes-Garcia Z, Oliveira MC, Lima RL, Soriani FM, Cisalpino D, Botion LM, et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. *Obesity*. 2014;22(3):663–72.
19. Yoshimura TM, Sabino CP, Ribeiro MS. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. *Journal of Biophotonics*. 2016 1;9(11–12):1255–62.

20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;6 (18): 499–502.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
22. Danilenko K v., Mustafina S v., Pechenkina EA. Bright light for weight loss: Results of a controlled crossover trial. *Obesity Facts*. 2013;6(1):28–38.
23. Dunai A, Novak M, Chung SA, Kayumov L, Keszei A, Levitan R, Shapiro CM. Moderate exercise and bright light treatment in overweight and obese individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(7):1749-57. doi: 10.1038/oby.2007.208.
24. Roche GC, Shanks S, Jackson RF, Holsey LJ. Low-Level Laser Therapy for Reducing the Hip, Waist, and Upper Abdomen Circumference of Individuals with Obesity. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2017 1;35(3):142–9.
25. Thornfeldt CR, Thaxton PM, Hornfeldt CS. A Six-week Low-level Laser Therapy Protocol is Effective for Reducing Waist, Hip, Thigh, and Upper Abdomen Circumference. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(6):31-5.
26. Moon IJ, Choi JW, Jung CJ, Kim S, Park E, Won CH. Efficacy and safety of a novel combined 1060-nm and 635-nm laser device for non-invasive reduction of abdominal and submental fat. *Lasers Med Sci*. 2022;37(1):505-512. doi: 10.1007/s10103-021-03288-z
27. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(8):946-65. doi: 10.1007/s001250100596
28. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metabolism*. 2009 4;9(2):203–9.
29. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151(2):400-413.
doi:10.1016/j.cell.2012.09.010

30. Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med.* 2013;45(6):349-57. doi: 10.1002/lsm.22153

31. Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res.* 1997;36(1):43-53. doi: 10.1016/s0163-7827(97)00003-9

32. Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev.* 1995;75(1):47-76. doi: 10.1152/physrev.1995.75.1.47

33. Wueest S, Rapold RA, Schumann DM, Rytka JM, Schildknecht A, Nov O, *et al.* Deletion of Fas in adipocytes relieves adipose tissue inflammation and hepatic manifestations of obesity in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2010 4;120(1):191–202

34. Mobbs CV, Makimura H. Block the FAS, lose the fat. *Nat Med.* 2002;8(4):335-6. doi: 10.1038/nm0402-335.

35. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000 30;288(5475):2379-81. doi: 10.1126/science.288.5475.2379

36. Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 28;99(11):7809.

37. Blüher M, Klötting N, Wueest S, Schoenle EJ, Schön MR, Dietrich A, *et al.* Fas and FasL expression in human adipose tissue is related to obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2014;99(1).

38. Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Klötting N, Fasshauer M, Schön MR, *et al.* Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: Association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(7):1472–80.

Legendas das figuras

Fig 1. Linha do tempo do estudo.

ST: dieta padrão; HCD: dieta hiperglicídica; USG: ultrassonografia; TAE: tecido adiposo epididimal; LED: *Light-Emitting Diode*; ipTTG: teste intraperitoneal de tolerância à glicose; ipTSI: teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina.

Fig 2. Fase de indução de obesidade. Variação do peso corporal (final – inicial) (A), espessura do tecido adiposo epididimal por ultrassonografia (B), consumo alimentar em Kcal (C). Dados apresentados em médias + erro padrão da média (n= 6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram indicadas como **a** entre ST e HCD, **b** entre ST e LED+I, **c** entre ST e LED+A.

Fig 3. Efeitos do LED sobre a composição corporal, consumo alimentar e morfologia do tecido adiposo branco e marrom de camundongos. Variação do peso corporal (final – inicial) (A), peso do tecido adiposo epididimal corrigido (B), adiposidade visceral (C), peso do tecido adiposo marrom corrigido pelo peso corporal (D), consumo alimentar em Kcal (E), coloração representativa em hematoxilina e eosina (H&E) do tecido adiposo branco e marrom. Dados apresentados em médias + erro padrão da média (n= 6 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram indicadas como **a** entre ST e HCD, **b** entre ST e LED+I, **c** entre ST e LED+A, **d** entre HCD e LED+I, **e** entre HCD e LED+A.

Fig 4. Efeitos do LED sobre os perfis bioquímicos glicêmico e lipídico e na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose de camundongos. Colesterol total (A), triglicerídeos (B), lipoproteína de alta densidade (HDL-c (C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (D), glicemia de jejum (E), insulina sérica (F), níveis de glicose sanguínea associados ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose (G) e ao teste intraperitoneal de sensibilidade à insulina (H). Dados apresentados em médias + erro padrão da média (n=5 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os grupos foram indicadas como **a** entre ST e HCD, **b** entre ST e LED+I, **c** entre ST e LED+A, **d** entre HCD e LED+I, **e** entre HCD e LED+A.

Fig 5. Efeitos do LED na expressão de mRNA de marcadores associados à termogênese e à lipólise/lipogênese por qRT-PCR no tecido adiposo marrom e branco de camundongos. Níveis de expressão de mRNA de PRDM16 (A), UCP1 (B), CPT-1 (C), FAS (D), SRBEP1c (E). Dados apresentados em médias+ erro padrão da média (n=4 animais/grupo). Diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os grupos foram indicadas como **a** entre ST e HCD, **b** entre ST e LED+I, **c** entre ST e LED+A, **d** entre HCD e LED+I, **e** entre HCD e LED+A.

Figuras

Figura 1.

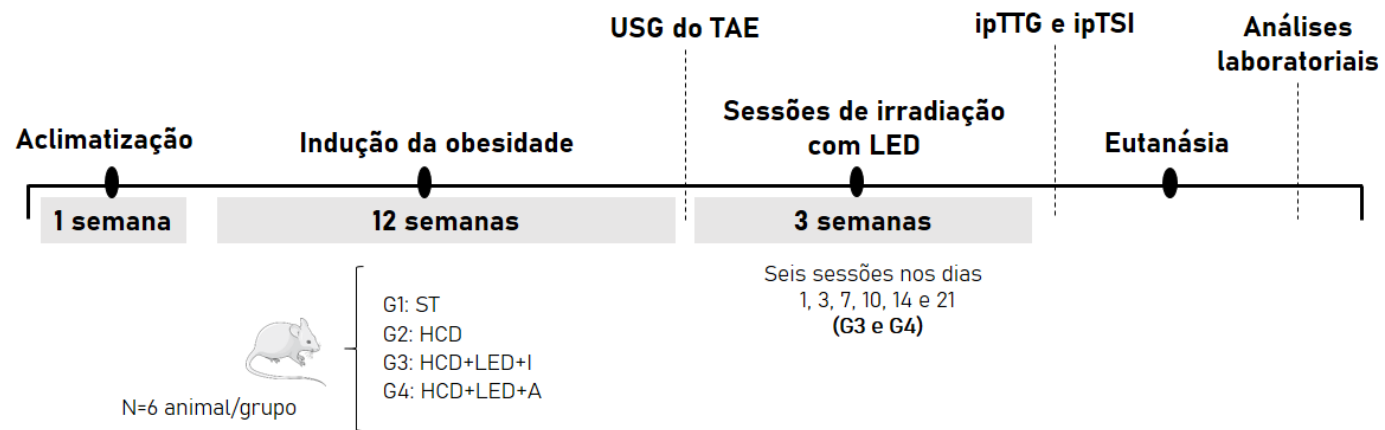


Figura 2.

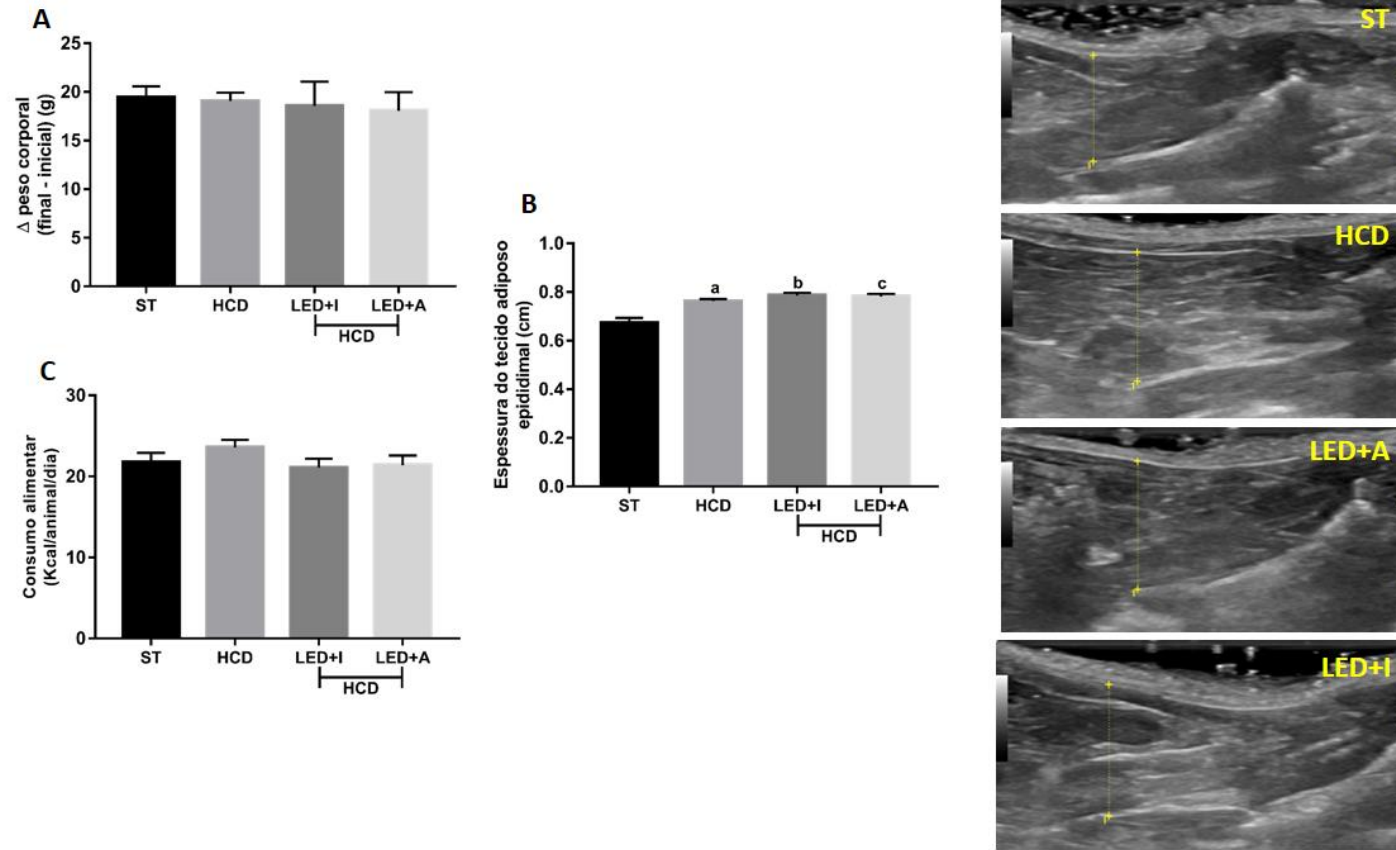


Figura 3.

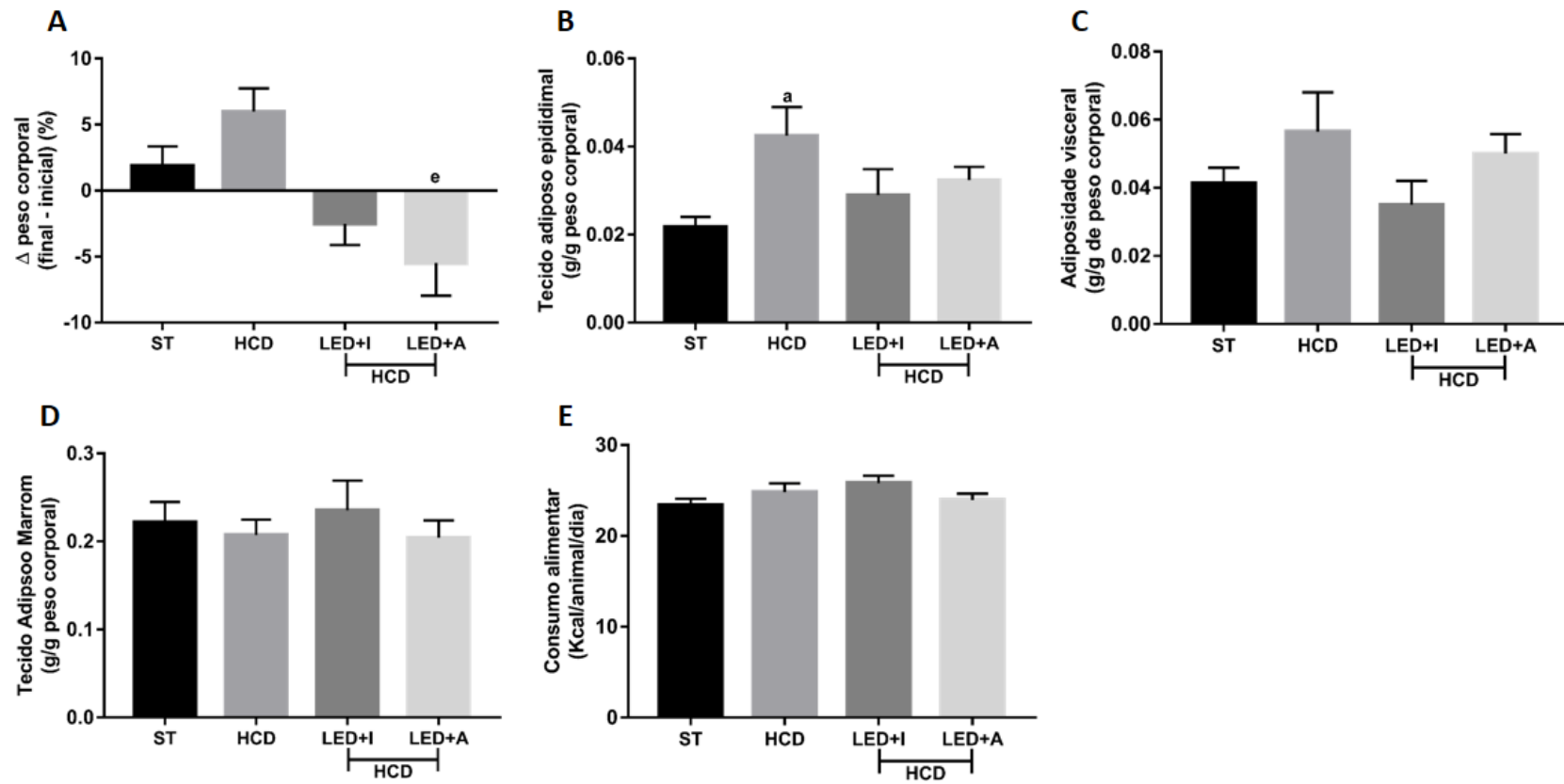


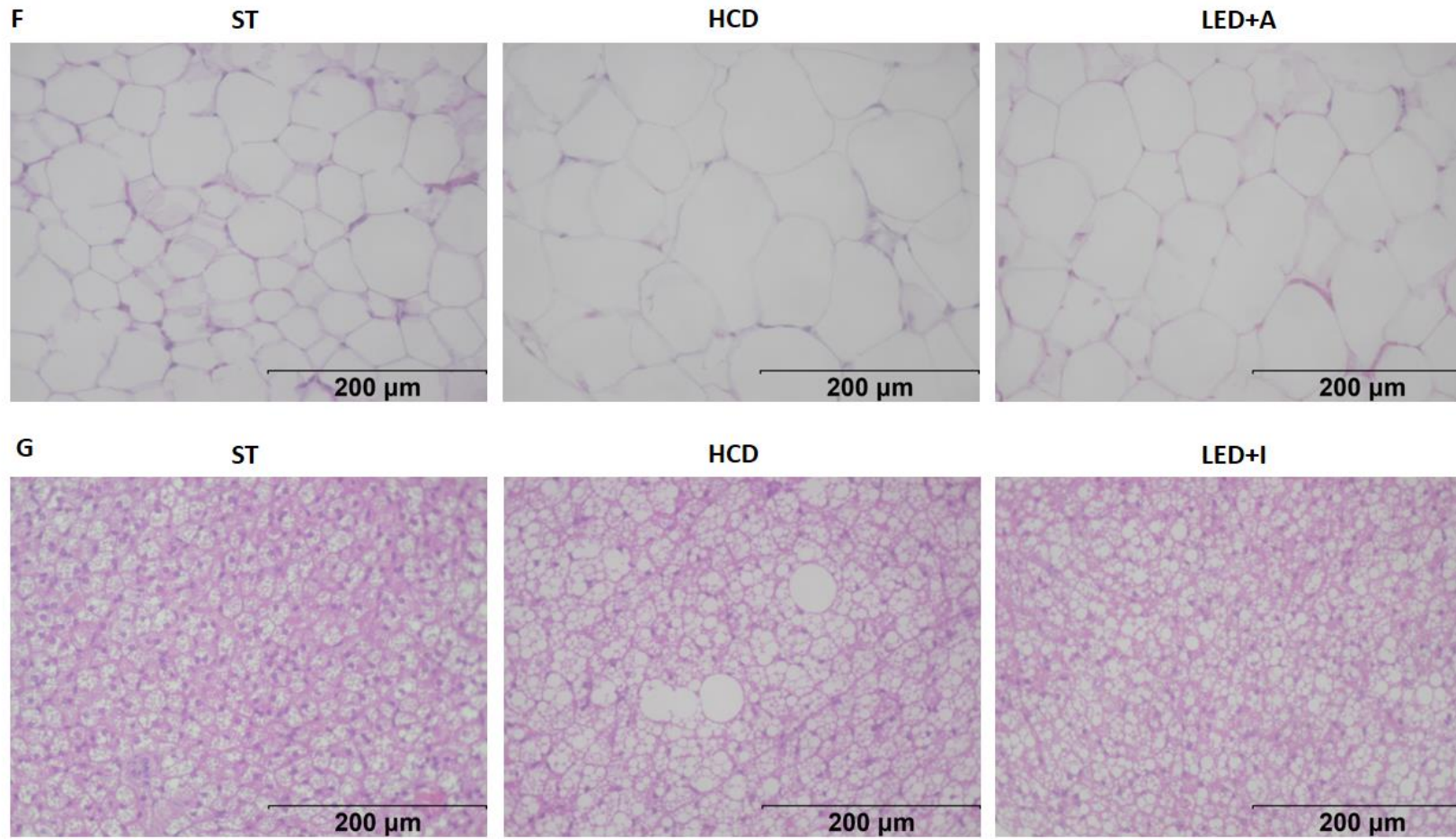
Figura 3 (continua).

Figura 4.

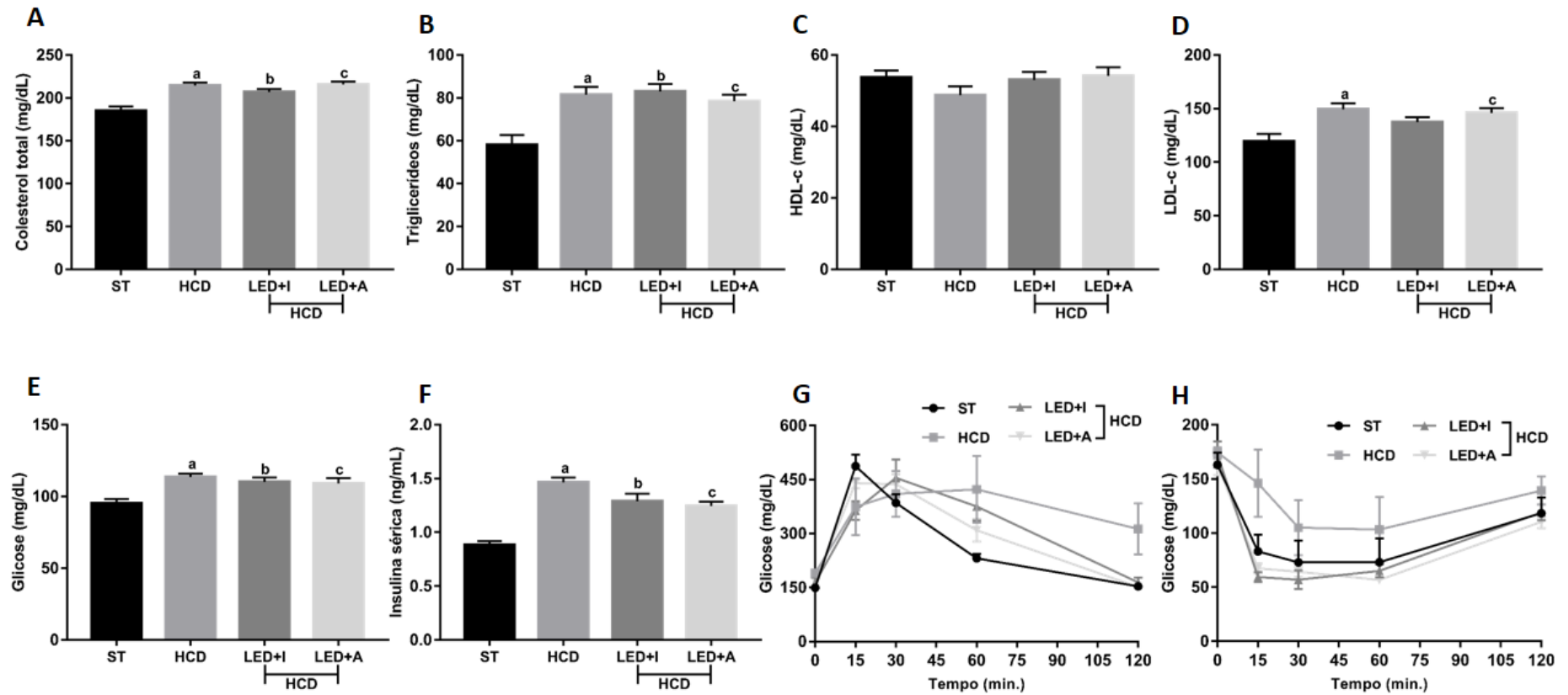
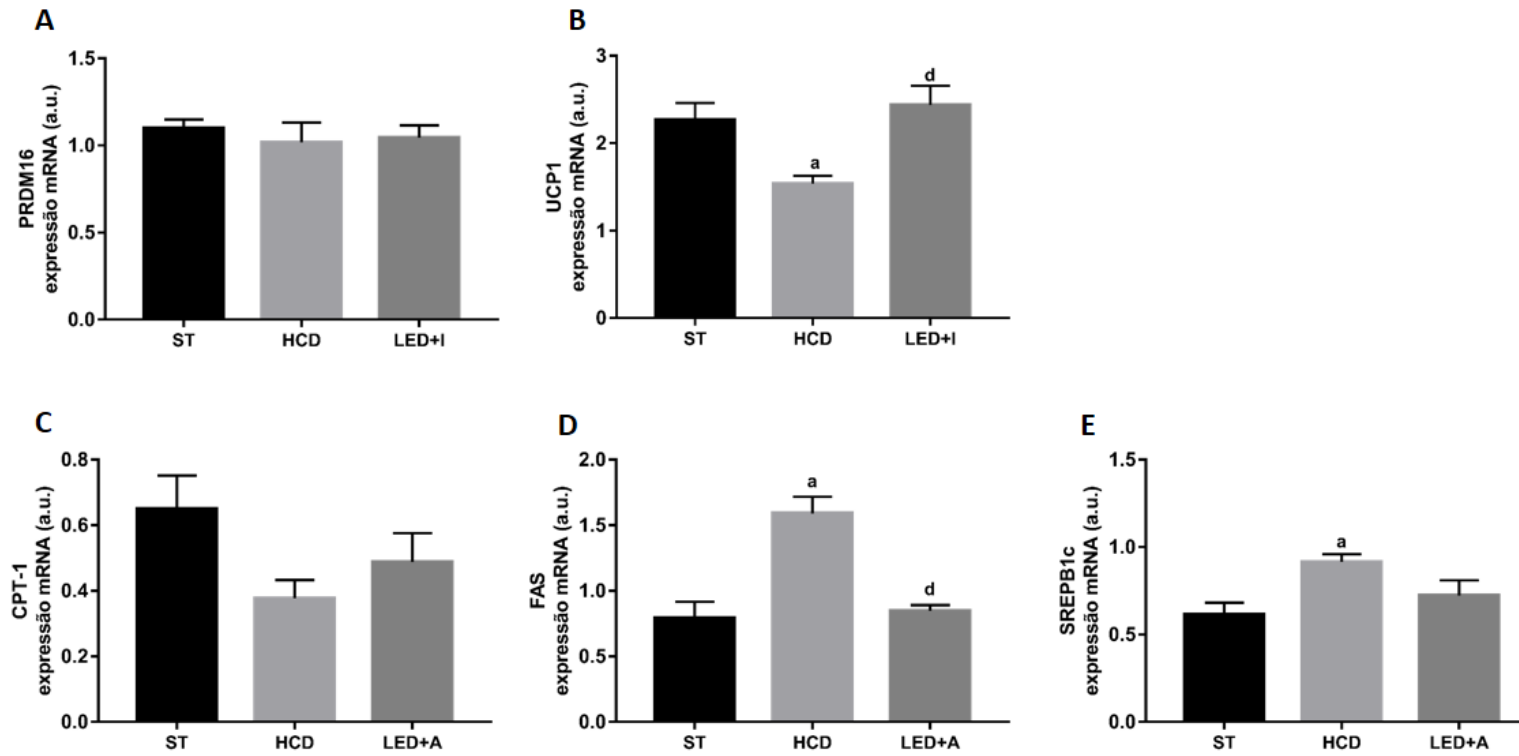


Figura 5.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que o uso do LED pode tornar-se uma importante estratégia complementar no auxílio do tratamento da obesidade, devido sua capacidade em modular aspectos morfológicos e funcionais do tecido adiposo branco e marrom. Pode-se observar que o uso do LED levou a alterações corporais de peso e adiposidade, possivelmente associadas a alteração da expressão de UCP1 e FAS. Devido limitações metodológicas relacionados ao uso de comum do espaço e equipamentos de laboratórios durante a pandemia, custos com reagentes para análises, a manutenção de alguns equipamentos de pesquisa, a escassez de outros estudos similares na literatura científica, além da necessidade urgente de descoberta de opções terapêuticas para a obesidade, faz-se necessário o aprofundamento da compreensão dos efeitos do LED no tecido adiposo.

REFERÊNCIAS

1. González-Muniesa, P., Martínez-González, MA., Hu, F. *et al.* Obesity. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17034 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
2. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep.* 2015 Sep;4(3):363-70. doi: 10.1007/s13679-015-0169-4
3. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009 Mar 28;373(9669):1083-96. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60318-4
4. di Cesare M, Bentham J, Stevens GA, Zhou B, Danaei G, Lu Y, et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet.* 2016 Apr 2;387(10026):1377–96.
5. Brazil. Ministry of Health. Food and nutrition situation in Brazil: overweight and obesity in the adult population in Primary Health Care. Ministry of Health. 2020. http://189.28.128.100/dab/docs//portaldab/documentos/atlas_situacao_alimentar_nutricional.pdf
6. Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhão TA, de Souza CP, Araujo DV. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2012 Jun 18;12:440. doi: 10.1186/1471-2458-12-440
7. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine.* 2017 Jan 19;376(3):254–66.
8. Karpe F, Pinnick KE. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue--link to whole-body phenotypes. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Feb;11(2):90-100. doi: 10.1038/nrendo.2014.185.

9. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Nov;13(11):633-643. doi: 10.1038/nrendo.2017.90.
10. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Feb 25;7:22. doi: 10.3389/fcvm.2020.00022.
11. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003
12. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548-56. doi: 10.1210/jc.2004-0395.
13. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85-97. doi: 10.1038/nri2921.
14. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):26-35. doi: 10.1038/nrendo.2016.136.
15. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, *et al*. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity*. 2011 Jan;19(1):13-6.
16. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1252-63. doi: 10.1038/nm.3361.
17. Reddy P, Lent-Schochet D, Ramakrishnan N, McLaughlin M, Jialal I. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clin Chim Acta*. 2019 Sep; 496:35-44. doi: 10.1016/j.cca.2019.06.019
18. Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Mar;15(3):139-154. doi: 10.1038/s41574-018-0126-x

19. Nye C, Kim J, Kalhan SC, Hanson RW. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* 2008 Dec;19(10):356-61. doi: 10.1016/j.tem.2008.08.003.
20. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1801(3):209-14. doi: 10.1016/j.bbali.2009.10.006.
21. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77. doi: 10.1038/nrm2391.
22. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000 Nov 15;529 Pt 1(Pt 1):3-10. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00003.x.
23. Basolo A, Bechi Genzano S, Piaggi P, Krakoff J, Santini F. Energy Balance and Control of Body Weight: Possible Effects of Meal Timing and Circadian Rhythm Dysregulation. *Nutrients.* 2021; 13(9):3276. doi.org/10.3390/nu13093276
24. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine.* 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
25. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1500-8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
26. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine.* 2009 Apr 9;360(15):1518–25.
27. Hankir MK, Klingenspor M. Brown adipocyte glucose metabolism: a heated subject. *EMBO Rep.* 2018 Sep;19(9):e46404. doi: 10.15252/embr.201846404.

28. Shanks S, Leisman G. Perspective on Broad-Acting Clinical Physiological Effects of Photobiomodulation. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1096:41-52. doi: 10.1007/5584_2018_188
29. Theodoro V, de Oliveira Fujii L, Lucke LD, et al. Inhibitory effect of red LED irradiation on fibroblasts and co-culture of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Heliyon.* 2020;6(5):e03882. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03882
30. Kim WS, Calderhead RG. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther.* 2011;20(3):205-15. doi: 10.5978/islsm.20.205.
31. Calderhead RG, Vasily DB. Low Level Light Therapy with Light-Emitting Diodes for the Aging Face. *Clin Plast Surg.* 2016 Jul;43(3):541-50. doi: 10.1016/j.cps.2016.03.011.
32. Danilenko K v., Mustafina S v., Pechenkina EA. Bright light for weight loss: Results of a controlled crossover trial. *Obesity Facts.* 2013;6(1):28–38.
33. Dunai A, Novak M, Chung SA, Kayumov L, Keszei A, Levitan R, Shapiro CM. Moderate exercise and bright light treatment in overweight and obese individuals. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Jul;15(7):1749-57. doi: 10.1038/oby.2007.208.
34. Roche GC, Shanks S, Jackson RF, Holsey LJ. Low-Level Laser Therapy for Reducing the Hip, Waist, and Upper Abdomen Circumference of Individuals with Obesity. *Photomed Laser Surg.* 2017 Mar;35(3):142-149. doi: 10.1089/pho.2016.4172
35. Thornfeldt CR, Thaxton PM, Hornfeldt CS. A Six-week Low-level Laser Therapy Protocol is Effective for Reducing Waist, Hip, Thigh, and Upper Abdomen Circumference. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016 Jun;9(6):31-5.
36. Moon IJ, Choi JW, Jung CJ, Kim S, Park E, Won CH. Efficacy and safety of a novel combined 1060-nm and 635-nm laser device for non-invasive reduction of abdominal and submental fat. *Lasers Med Sci.* 2022 Feb;37(1):505-512. doi: 10.1007/s10103-021-03288-z.