

# AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA - LLLT – EM CÉLULAS 3T3-L1.

Juliana do Nascimento Pereira Orphão<sup>1</sup>; Carla de Brito Teixeira<sup>2</sup>; Arthur Barbosa Vecchi Lopes<sup>3</sup>; Fernando Francisco Pazello Mafra<sup>4</sup>; Michel Monteiro Macedo<sup>5</sup>; Rodrigo Brandão Lopes Martins<sup>6</sup>

Estudante do curso de Nutrição; e-mail: julianaorphao@outlook.com<sup>1</sup>

Estudante do curso de Nutrição; e-mail: carlinhadebrito@hotmail.com<sup>2</sup>

Estudante do curso de Educação Física; e-mail: vecchilopes@gmail.com<sup>3</sup>

Doutorando em Engenharia Biomédica; fernando.mafra@bol.com.br<sup>4</sup>

Doutorando em Engenharia Biomédica; mm.chel@hotmail.com<sup>5</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ralopesmartins@gmail.com<sup>6</sup>

Área De Conhecimento: Biologia Molecular; Física medicinal;

Palavras Chaves: laserterapia; célula adiposa; Lipase Hormônio sensível

## INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo, sendo regulado funcionalmente pelas sinalizações endócrinas, autôncrinas, neurocrinas e parácrinas (Frühbeck, Gomez-Ambrozi, Muruzábel & Burrell, 2001). O tecido adiposo branco (TAB), é formado logo no início da gestação a partir de células derivadas do mesênquima. As células deste tecido possuem gotículas lipídicas que são inicialmente separadas umas das outras, porém, muitas delas se fundem, formando a gotícula única que ocupa aproximadamente 85-90% do citoplasma, segundo Fonseca-Alaniz *et al.* (2006). Em situações de restrição de energia, ocorre a lipólise, processo definido como a hidrólise de TAG para a geração de ácidos graxos e glicerol, sob a influência das catecolaminas, que são liberados na corrente sanguínea para utilização em outros órgãos (Duncan *et al.* 2007; Havel, 2004; Hauner, 2004). Na literatura já foram estudados os efeitos da Laserterapia de Baixa Potência (LLLT - *Low Level LASER therapy*) no tecido adiposo. Neira *et al.* (2002), investigaram o efeito de 635 nm, 10 mW de radiação laser de diodo com exclusivos óptica de dispersão de energia. Os valores de energia total de 1,2 J / cm (2), 2,4 J / cm (2), e 3,6 J / cm (2) foram aplicados sobre tecido adiposo humano proveniente de mulheres saudáveis. As amostras de tecido foram irradiadas durante 0, 2, 4 e 6 minutos com e sem solução tumescente, mostrando que, após 4 minutos de exposição ao laser, 80% por cento de gordura foi liberada das células adiposas; aos 6 minutos de exposição ao laser, 99% de gordura foi liberada do adipócito, sendo coletada no espaço intersticial. Entretanto, os dados na literatura ainda são muito escassos referente aos efeitos da LLLT no adipócito.

## OBJETIVOS

Analisar os efeitos moleculares da LLLT nas respostas lipolíticas do tecido adiposo.

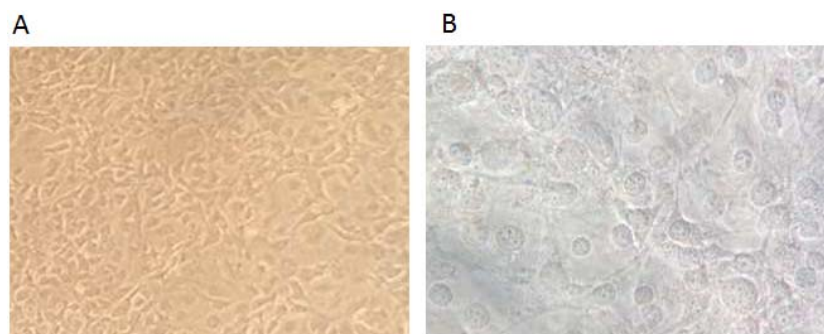
## METODOLOGIA

Para o presente projeto, foi utilizada a linhagem 3T3-L1, sendo mantidas em meio DMEM contendo 2% de bicarbonato de sódio suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino.  $3 \times 10^3$  de células foram diferenciadas com meio de diferenciação (meio BMII, 0,5mM de IBMX, 1 µg/mL de insulina recombinante, 0,25 µM de dexametasona e 2

$\mu\text{M}$  de rosiglitazona) por 48 horas e, manutenção com  $1 \mu\text{g/mL}$  de insulina por 72 horas para diferenciação total. As células foram irradiadas nas próprias placas de cultura utilizando um diodo de LASER de  $904 \text{ nm}$  (THOR Photomedicine Ltd, Chesham, UK). Foram ofertados 1J, 2J e 3J de energia total. Após 4 horas da irradiação, o meio de cultura foi coletado e as células ressuspendidas no próprio tampão do kit para a atividade da Lipase Hormônio sensível. A quantificação dos níveis de triglicerídeos no meio de cultura foi realizada utilizando o kit triglicérides monoreagente (Bioclin - Brasil) e a atividade da Lipase Hormônio Sensível pelo kit Lipase Activity Assay (Sigma Aldrich - EUA) posteriormente à quantificação de proteínas feita através do kit  $660 \text{ nm}$  Pierce Protein Assay Kit (Thermo Scientific - EUA). Os resultados foram analisados

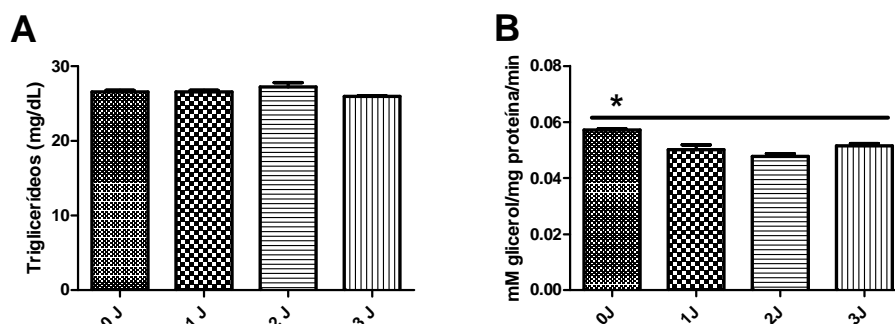
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células 3T3-L1 inicialmente em cultura apresentam característica achatada quando aderidas na placa (figura 1A). Seguindo com o protocolo de diferenciação, é possível verificar que após a aplicação do coquetel de diferenciação (meio BMII,  $0,5 \text{ mM}$  de IBMX,  $1 \mu\text{g/mL}$  de insulina recombinante,  $0,25 \mu\text{M}$  de dexametasona e  $2 \mu\text{M}$  de rosiglitazona), por um período de 48 horas, foi possível verificar a mudança de fenótipo da célula (figura 1B).



**Figura 1:** Células 3T3-L1 cultivadas em DMEM, 10% de Soro Fetal Bovino. A = células 3T3-L1 não diferenciadas; B = células 3T3-L1 após protocolo de diferenciação.

Não houveram diferenças nos níveis de triglicerídeos no meio de cultura (Figura 2A), porém, foi possível observar uma queda na atividade enzimática da Lipase Hormônio Sensível quando realizada a irradiação com LASER infravermelho.



**Figura 2:** Efeitos da LLLT na liberação de triglicerídeos para o meio e atividade enzimática de Lipase Hormônio Sensível. **A:** Quantificação de triglicerídeos do meio de cultura das células 3T3-L1 diferenciadas após o tratamento com diferentes doses de LASER infravermelho. 0J =  $26,5856 \pm 0,52$ ; 1J =  $26,5856 \pm 0,52$ ; 2J =  $27,2372 \pm 1,41$ ;

3J = 25,9991 ± 0,1303, p = 0,18. **B:** 0J = 0,057 + 0,0008; 1J = 0,050 + 0,0003; 2J = 0,0477 + 0,002; 3J = 0,051 ± 0,002. p = 0,0003 do grupo 0 J em relação aos demais.

## **CONCLUSÕES**

Foi demonstrado no presente trabalho que a irradiação LASER infravermelho nas células 3T3-L1 induziu uma queda na atividade da enzima Lipase Hormônio Sensível e que, provavelmente, este efeito possa ser observado também em vivo, porém, não houveram alterações nas concentrações de triglicerídeos no meio de cultura coletado após o protocolo de irradiação. Mais análises devem ser conduzidas para melhor esclarecimento do fenômeno observado.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Frühlbeck, G., Gomez-Ambrozi, J; Muruzábel, F. J & Burrell, M. A. The adipocyte: model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy and metabolic regulation. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab.*, 2001;280: E827 – E847.**

**Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB.** The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50:216–29.

**Duncan E. R.; Ahmadian M.; Jaworski K.; Sarkadi-Nagy E.; Sook H.** Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27: 79–101.

**Neira R, Arroyave J, Ramirez H, Ortiz CL, Solarte E, Sequeda F, Gutierrez.** Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 110:912–925