



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise imunohistoquímica do marcador de Células-Tronco  
Derivadas do Tecido Adiposo CD49 em Ratos Submetidos  
à Dieta Hiperlipídica e Laserterapia**

**LAILA DA SILVA SANTOS**

Salvador – BA

2016

LAILA DA SILVA SANTOS

**Análise imunohistoquímica do marcador de Células-Tronco  
Derivadas do Tecido Adiposo CD49 em Ratos Submetidos  
à Dieta Hiperlipídica e Laserterapia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal da Bahia como requisito para a obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aparecida Maria Cordeiro Marques

Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Maria Pedreira Ramalho

Salvador – BA

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

Santos, Laila da Silva

Análise imunohistoquímica do marcador de Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo CD49 em Ratos Submetidos à Dieta Hiperlipídica e Laserterapia / Laila da Silva Santos. – Salvador, 2016.

65 f.: il

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aparecida Maria Cordeiro Marques

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciana Maria Pedreira Ramalho

Dissertação (Mestrado - Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2016.

1. Reparo Tecidual. 2. Laserterapia. 3. Células-tronco. 4. Imunohistoquímica. I. Marques, Aparecida Maria Cordeiro. II. Ramalho, Luciana Maria Pedreira. III. Título.

# LAILA DA SILVA SANTOS

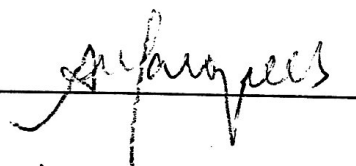
## Análise imunohistoquímica do marcador de células-tronco derivadas do tecido adiposo cd49 em ratos submetidos à dieta hiperlipídica e laserterapia

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 26 de agosto de 2016.

### BANCA EXAMINADORA:

Aparecida Maria Cordeiro Marques – Orientadora  
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.



Antônio Luiz Barbosa Pinheiro  
Doutor em Clinical Dentistry pela University of Birmingham,  
Reino Unido.  
Universidade Federal da Bahia.



Juliana Santos de Carvalho Monteiro  
Doutora em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Estadual de Feira de Santana.



## DEDICATÓRIA

À minha mãe Silvana Moreira, por todo incentivo e apoio às minhas decisões no percurso da minha caminhada.

À toda minha família e amigos, pelo carinho, apoio e torcida pelas conquistas, e pela compreensão que os momentos de ausência foram recompensados.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Sarah Westphal

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, ou qualquer outra Força maior, por ter me dado resiliência e sabedoria para lidar com os problemas.

À minha mãe, **Silvana Moreira**, por ser um exemplo diário de garra e força e, pelo seu amor mesmo quando ele não é dito.

Ao meu pai, **Cleosvaldo Brito**, pelo seu esforço em recuperar o tempo perdido.

A **Leonardo**, meu amor e melhor amigo, pelas suas mãos dadas em todos os momentos bons e ruins.

À minha querida vovó, **Dona Mari**, por nunca deixar eu esquecer a criança que vive dentro de mim.

À mais do que amada **família Moreira**, tios e tias, primos e primas, madrinha e padrinho de coração, pela imensa torcida e sempre muito bem apreciadas comemorações.

À Prof. Dra. **Aparecida Marques**, minha orientadora, uma mestra tão competente, doce e simples ao mesmo tempo, agradeço imensamente por abraçar uma aluna tão “verde” ainda, e guiar-me com tanto carinho e paciência.

À Prof. Dra. **Luciana Ramalho**, minha co-orientadora, por ter me dado a oportunidade de conhecer de perto a profissional e pessoa maravilhosa que é. Agradeço imensamente por toda sua ajuda durante todos esses anos desde a graduação, pois sem ela, não saberia apreciar a beleza que é ser docente e cientista.

À Prof. Dra. **Tânia Rodriguez**, por mostra-me que, independente da altura da posição que você alcance, a humildade nos faz seres humanos mais brilhantes.

À Prof. Dra. **Flávia Caló**, por ceder seu tempo e sabedoria nas análises experimentais da pesquisa com tanta graça e compreensão.

À Prof. Dra. **Tininha Cangussu**, a quem devo toda análise estatística do trabalho.

Ao Prof. Dr. **Antonio Pinheiro**, por ser desde a graduação uma enorme referência no mundo da luz. Agradeço pela sua missão em formar grandes pesquisadores.

À **Lívia Vitória** e **Virgínia Uzeda**, duas aprendizes que como eu, seguraram a minha mão durante toda o projeto e souberam acalmar e ajudar uma acadêmica iniciante. Agradeço por hoje ter duas amigas.

À estudante de iniciação científica, **Eliza Kauark**, pela sua doação ao projeto, pela sua curiosidade e pela sua vontade em aprender sempre mais.

Aos **Mestres do Programa de Biotecnologia**, pelos ensinamentos totalmente inovadores, e por me fazerem perceber que Biologia e Saúde são muito maiores do que dentes, gengiva e osso alveolar.

Aos **colegas do Mestrado**, pelas experiências e conhecimentos trocados durante um ano intenso de aulas, seminários e provas. Lembrarei para sempre de cada um.

Ao Sr<sup>o</sup> **Edilson Amancio**, pela disponibilidade e cuidado na confecção das lâminas.

À **FAPESB**, pelo apoio à pesquisa e investimento na minha qualificação profissional.

Ao **Instituto de Ciências da Saúde**, por ceder seu espaço para os conhecimentos teóricos e realização da parte experimental da pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia da UFBA**, minha eterna casa, onde realizei as análises finais da pesquisa, e onde sempre será um grande prazer retornar.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
2.1 SOBREPESO E OBESIDADE	17
2.1.1 TECIDO ADIPOSEO	18
2.2 REPARO TECIDUAL	22
2.2.1. REPARO TECIDUAL E LASERTERAPIA	23
2.3 CÉLULAS-TRONCO	24
2.3.1 CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO	26
2.4 LASER	30
2.4.1 LASERTERAPIA	31
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	36
3.1.OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b>	37
4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	37
4.2 AMOSTRA	37
4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	37
4.4 MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL	38
4.5 AVALIAÇÃO PONDERAL	39
4.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	40
4.7 PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO	41
4.8 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	43
4.9 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO	44
4.10 ANÁLISE DOS DADOS	47
<b>5. RESULTADOS</b>	48
5.1 AVALIAÇÃO DO PESO DA GORDURA RETROPERITONEAL	48
5.2 ANÁLISE DESCRITIVA	48
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>6. DISCUSSÃO</b>	53
<b>7. CONCLUSÃO</b>	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
<b>ANEXO</b>	65

**LISTA DE QUADRO E TABELAS**

Quadro 01	Distribuição dos ratos nos grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta, protocolo de irradiação e tempo experimental (UFBA, 2014).	38
Tabela 01	Composição da dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH)	39
Quadro 02	Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação (UFBA, 2014).	42
Quadro 03	Descrição do anticorpo primário utilizado na reação imunohistoquímica (UFBA, 2016).	46
Quadro 04	Critérios utilizados na análise imunohistoquímica (UFBA, 2016).	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Ração Hiperlipídica e Ração Padrão (UFBA, 2014).	39
Figura 02	Ratos dos grupos Dieta Hiperlipídica e Dieta Padrão (UFBA, 2014).	40
Figura 03	Demarcação dos pontos correspondentes ao ângulo da ferida cirúrgica (UFBA, 2014).	41
Figura 04	Incisão para confecção da ferida (UFBA, 2014).	41
Figura 05	Ferida cirúrgica imediatamente após a sua confecção (UFBA, 2014).	41
Figura 06	Aparelho utilizado para realização da fototerapia laser (UFBA, 2014).	43
Figura 07	Irradiação da ferida cirúrgica com a luz Laser de emissão vermelha (UFBA, 2014).	43
Figura 08	Gordura retroperitoneal Grupo Dieta Padrão (UFBA, 2014).	44
Figura 09	Gordura retroperitoneal Grupo Dieta Hiperlipídica (UFBA, 2014).	44
Figura 10	Peso relativo da gordura retroperitoneal após 20 semanas de dieta padrão e hiperlipídica.	48
Figura 11	Comparação entre os grupos Dieta Padrão Laser e Dieta Hiperlipídica Laser avaliados no período de 7 dias localizado na derme do tecido (UFBA, 2016).	49
Figura 12	Comparação entre os grupos Dieta Padrão Controle e Dieta Hiperlipídica Controle avaliados no período de 14 dias localizado na derme do tecido (UFBA, 2016).	52
Figura 13	Comparação entre os grupos Dieta Hiperlipídica Controle e Dieta Hiperlipídica Laser avaliados no período de 14 dias localizado na hipoderme do tecido (UFBA, 2016).	50
Figura 14	Fotomicrografia do grupo Dieta Padrão Laser aos 7 dias mostrando intensidade da imunomarcacão moderada na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).	51
Figura 15	Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Laser aos 7 dias mostrando intensidade da imunomarcacão fraca na derme (aumento aproximado de 10X) (UFBA, 2016).	51
Figura 16	Fotomicrografia do grupo Dieta Padrão Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcacão moderada na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).	51

- Figura 17 Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcção fraca na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016). 51
- Figura 18 Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Laser aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcção intensa na hipoderme (aumento aproximado de 10X) (UFBA, 2016). 52
- Figura 19 Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcção fraca na hipoderme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016). 52

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ATP Adenosina-trifosfato

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

cm Centímetro

cm<sup>2</sup> Centímetros quadrados

CW Continuous wave

DNA Ácido desoxirribonucléico

et al. e colaboradores

FOUFBA Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia

GaAs Arseneto de gálio

GaAlAs Arseneto de gálio-alumínio

g Grama

°C Grau Celsius

HeNe Hélio Neônio

HE Hematoxilina-eosina

ICS Instituto de Ciências da Saúde

J Joule

J/cm<sup>2</sup> Joules por centímetros quadrados

Kg Quilograma

Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

(Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

LTBI Laserterapia de Baixa Intensidade

LED Light Emmitting Diode (Diodo emissor de luz)

ml Mililitro

mm Milímetro

mW Miliwatts

min Minuto

nm Nanômetro

O<sub>2</sub> Oxigênio

p Probabilidade de erro ou variabilidade amostral

s Segundo(s)

SAEF Spatial Average Energy Influence

(Densidade de energia média espacial)

t Tempo

TBE Tribromoetanol

UFBA Universidade Federal da Bahia

W Watts

W/cm<sup>2</sup> Watt por centímetro quadrado

$\lambda$  Comprimento de onda

$\mu\text{m}$  Micrômetro

$\Phi$  Diâmetro do Spot

% Porcentagem

® Marca registrada

SANTOS, Laila da Silva. Análise imunohistoquímica do marcador de células-tronco derivadas do tecido adiposo CD49 em ratos submetidos à dieta hiperlipídica e laserterapia. 65 f. il. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## RESUMO

O Laser é fotobiomodulador celular consagrado que vem despertando o interesse da sua utilização na proliferação e diferenciação de células-tronco. Verificou-se a influência da fototerapia Laser ( $\lambda 660\text{nm}$ ,  $40\text{mW}$ ,  $6\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $\phi 0,04\text{cm}^2$ , CW, *Twin Flex Evolution*, MMOptics®, São Carlos, SP) na imunomarcagem com o marcador de células-tronco CD49 no tecido adiposo de ratos submetidos a dieta hiperlipídica. Quarenta e oito ratos *Wistar albinus*, desmamados foram divididos em dois grupos experimentais: Dieta Padrão (DP) e Dieta Hiperlipídica (DH), alimentados com suas respectivas rações por 20 semanas. Em seguida, os ratos foram submetidos à anestesia geral para confecção de feridas cutâneas dorsais, excisionais, padronizadas em  $1\text{cm}^2$ . Os grupos foram subdivididos em DPC e DHC sem tratamento adicional e DPL e DHL irradiados pelo protocolo supracitado, imediatamente após o ato cirúrgico e a cada 48 horas durante 7 ou 14 dias. Os ratos foram mortos por aprofundamento anestésico, os espécimes processados pela técnica de imunohistoquímica e avaliados por microscopia de luz. O grupo DPC apresentou anticorpos marcados com intensidade de moderada a intensa, enquanto no grupo DHC prevaleceu a coloração fraca para o tempo de 14 dias. O protocolo de irradiação empregado não teve influência sobre o marcador CD49 quando comparados os grupos controle e irradiados sob o mesmo período de tempo; no entanto, quando comparados os grupos DHL em 7 e 14 dias, o marcador apresentou aumento na intensidade da imunomarcagem em relação ao tempo, suscitando a hipótese da influência da luz laser sobre células-tronco adipoderivadas recrutadas para o processo de reparo tecidual.

Palavras-chave: reparo tecidual, laserterapia, células-tronco, imunohistoquímica

SANTOS, Laila da Silva. Immunohistochemical analysis of stem cell marker CD49 derived from adipose tissue in rats with high fat diet and laser therapy. 65 pp. ill. 2016. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

The Laser is consecrated cellular modulator that has aroused the interest of its use in the proliferation and differentiation of stem cells. It was verified the influence of phototherapy Laser ( $\lambda 660\text{nm}$ ,  $40\text{mW}$ ,  $6\text{ J / cm}^2$ ,  $\phi 0,04\text{cm}^2$ , CW, Twin Flex Evolution, MMOptics®, São Carlos, SP) on the immunostaining of CD49 stem cell marker in the adipose tissue of mice submitted to fat diet. Forty-eight Wistar albinus, weaned were divided into two groups: standard diet (SD) and high fat diet (DH), for 20 weeks. Then the rats were submitted to general anesthesia for making skin dorsal, excisional wounds, standardized in  $1\text{ cm}^2$ . The groups were divided into DPC and DHC without further treatment and DPL and DHL irradiated by the above protocol, immediately after surgery and every 48 hours for 7 or 14 days. The rats were killed by deep anesthesia, the specimens processed by immunohistochemistry and evaluated by light microscopy. The DPC group had antibodies labeled with moderate to severe intensity, while in DHC group prevailed weak staining on 14 days. The applied irradiation protocol had no influence on the CD49 marker when the control and irradiated groups were compared in the same period of time; however, comparing the DHL groups on 7 and 14 days, the marker showed increase in the intensity of immunostaining over time, raising the hypothesis of the influence of laser light on stem cells derived from adipose tissue recruited to the tissue repair process.

Keywords: tissue repair, lasertherapy, stem cells, immunohistochemistry



## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde sistêmico que já desperta a preocupação mundial. Essa desordem é causada por fatores de ordem nutricional, genética, metabólica, e até sócio-cultural (GHARAKHANLOU et al., 2011). Indivíduos classificados como obesos apresentam maiores riscos de desenvolver outras doenças sistêmicas e co-morbidades, dentre elas, o comprometimento do processo de reparação tecidual (BIONDO-SIMOES et al., 2010; JERONIMO, 2010), o que pode resultar em isquemia do tecido adiposo subcutâneo (BIONDO-SIMOES et al., 2010; GUO & DIPIETRO, 2010)

O tecido adiposo por muitos anos foi o grande “vilão” do sistema biológico por ser o maior reservatório de gorduras. No entanto, hoje, é reconhecido pelo seu potencial endócrino, além de uma fonte promissora de células-tronco (BASSI et al., 2012; MITTERBERGER et al., 2012; HUTTALA et al., 2015) de grande utilidade na Medicina gênica e tecidual (INÁCIO, 2011; ABRAHAMSE, 2012; ALVES, 2014; ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; FEKRAZAD<sub>a</sub> et al., 2016).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo são células adultas mesenquimais com potencial multipotente, ou seja, capazes de diferenciar-se em células de linhagem mesodermal (INÁCIO, 2011; ALVES, 2014; GEORGES, 2014). Essas células com a característica de autorrenovação são consideradas atualmente para o tratamento de várias doenças (ABRAHAMSE, 2012; ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; KUSHIBIKI et al., 2015; KIM et al., 2016), sendo, portanto, instrumentos de tecnologias modernas na área da saúde.

A prática clínica da terapia com laser de baixa potência tem sido investigada e utilizada há aproximadamente 20 anos (PIVA et al., 2011). Os efeitos biomodulatórios provenientes da interação entre o laser e o tecido biológico são capazes de estimular a proliferação fibroblástica, aumentar a produção de colágeno, diminuir o infiltrado inflamatório e, modificar reações enzimáticas normais, acelerando ou retardando estas reações (PIVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). Pode proporcionar ainda aumento na produção de ATP, o que promoveria um aumento na eficiência da bomba sódio-potássio (PIVA et al., 2011; BARBOZA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). O que justifica o seu uso em tecidos com o processo de cicatrização comprometida, como pode ocorrer em obesos.

Aliada à luz laser, as pesquisas com células-tronco ganham força no intuito de comprovar a eficácia da fototerapia na indução da diferenciação e proliferação das células mesenquimais (PARK et al., 2015; ZACCARA et al., 2015; BLATT et al., 2016),

e assim, solidificar mais uma área de atuação para essa tecnologia em benefício da população.

O reparo tecidual é um processo complexo que envolve 3 fases contínuas: inflamação, proliferação (formação do tecido) e regeneração (remodelamento tecidual). Várias vias intracelulares e intercelulares, envolvendo mediadores inflamatórios, são ativadas para que a integridade do tecido seja restaurada (SANTUZZI et al., 2011; OLIVEIRA e DIAS, 2012; VIEIRA ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; RUH et al., 2013). O processo de cicatrização tem como finalidade restabelecer a homeostase do organismo, assim, a sequência dessas fases deve ser mantida criteriosamente (LINS et al., 2010; OLIVEIRA e DIAS, 2012; VIEIRA ROCHA et al., 2012; RUH et al., 2013).

Clinicamente, é importante reduzir a área da ferida de forma tão rápida quanto possível, a fim de aliviar o estresse e reduzir a possibilidade de infecção (PIVA et al., 2011). Sendo assim, o aumento do número de indivíduos obesos que sofrem algum dano físico ou passam por procedimentos cirúrgicos desperta o interesse pela busca de informações das razões que impedem a cicatrização das suas feridas (OLIVEIRA e DIAS, 2012), para que dessa forma, surjam terapias que agilizem o reparo tecidual nessa parcela da população. A terapia laser tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória semelhante aos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) no processo de reparo do tecido, especialmente nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho próximo (LINS et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014).

Acelerar o reparo cicatricial é importante em indivíduos obesos, para que haja redução do custo hospitalares e antecipação do seu retorno às atividades sociais. No entanto, o efeito da biomodulação a laser com essa finalidade é carente na literatura. Assim, o presente estudo visa avaliar os efeitos da fototerapia laser durante a cicatrização de feridas em ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

## **2.2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. SOBREPESO E OBESIDADE**

A obesidade é o estado mais grave do excesso de peso. É caracterizada como a expansão da massa de tecido adiposo no corpo como resultado do desequilíbrio entre ingestão e gasto energético (GAIBA, 2012). Uma pessoa é considerada obesa quando esta condição afeta sua saúde física e mental e diminui sua expectativa de vida (MAGALHÃES et al, 2013).

Atualmente, a obesidade é considerada uma doença multifatorial, causada, principalmente, por má alimentação, sedentarismo, aumento da ingestão de alimentos calóricos industrializados (GHARAKHANLOU et al.,2011). Embora possua maior incidência nos países desenvolvidos, os países em desenvolvimento já vêm enfrentando o problema nos últimos anos (GHARAKHANLOU et al.,2011; PAVENLOSKI-COSTA et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade já assume características epidêmicas, é um problema de saúde pública. Sua previsão para o ano de 2015 foi de 700 milhões de pessoas obesas no mundo, e nesse ano de 2016 já emitiu um novo alerta para a obesidade infantil crescente. No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou em 2015 que 52% dos brasileiros encontravam-se na categoria “excesso de peso”, enquanto 17% mantinham-se na “obesidade”, chamando a atenção para o estilo de vida atual do brasileiro.

O excesso de peso e a obesidade nos adultos são comumente avaliados pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é uma medida simples de peso em relação à altura. Um IMC igual ou superior a 25 classifica a pessoa no grupo de sobrepeso e o IMC maior ou igual a 30 a classifica como obesa (MAGALHÃES et al., 2013; UZEDA E SILVA et al., 2016).

A grande preocupação em relação à obesidade é a sua associação como fator de risco para outras doenças sistêmicas, entre elas, resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão arterial (PAVENLOSKI-COSTA et al., 2011; CIGNARELLI et al., 2012; GAIBA, 2012; MAGALHÃES et al, 2013; SARTORI-CINTRA et al., 2013; WHITE et al., 2013), asma (SARTORI-CINTRA et al., 2013; YOUSSEF et al., 2013), alguns tipos de câncer (JERONIMO, 2010; CIGNARELLI et al., 2012; SARTORI-CINTRA et al., 2013), osteoporose, osteoartrite (SARTORI-CINTRA et al., 2013), bem como retardo no processo de cicatrização de feridas (BIONDO-SIMÕES et al., 2010; JERONIMO, 2010; SLAVKOVSKY et al., 2011; CIGNARELLI et al., 2012).

O tecido adiposo branco se distribui anatomicamente no organismo como subcutâneo e visceral (ZUTTON et al., 2013), podendo a gordura abdominal visceral e subcutânea ser medida com bastante precisão através de exames de imagem como a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) (GHARAKHANLOU et al., 2011; KAMIMURA et al., 2012), porém, seus altos custos impedem a utilização em larga escala, dando lugar a avaliações mais simples, como o índice de massa corporal (IMC) e Circunferência Abdominal (CA), a qual é a melhor medida antropométrica simples do tecido adiposo abdominal visceral, ainda, pode ser o melhor indicador para a previsão de riscos cardiovasculares (GHARAKHANLOU et al., 2011).

A obesidade é uma condição patológica que interfere na angiogênese (JERONIMO, 2010), o estado de hipóxia encontrado no tecido adiposo devido à sua expansão e o consequente afastamento entre os vasos e os adipócitos, justifica o prejuízo à cicatrização de feridas em pessoas obesas (BIONDO-SIMÕES et al., 2010). Contando que o crescimento de vasos a partir de outros vasos já pré-existentes são condições fundamentais em processos de reparo tecidual, esta doença prejudica diretamente o processo de cicatrização (JERONIMO, 2010). Além disso, a obesidade provoca alterações fisiológicas na pele, por conta das dobras na pele, tornam-se focos de abrigo para microorganismos que se desenvolvem em áreas úmidas e causam infecção, aliada à fricção causada, e pela diminuição da vascularidade do tecido adiposo, transformam-se em fatores de alto risco para o desenvolvimento de feridas na pele, que podem tornar-se crônicas (SCHWEINBERGER & ROUKIS, 2009).

O maior desafio para os profissionais de saúde que lidam com população obesa é a resolução das feridas sem complicações. Porém, para isso, requer destes mais conhecimentos acerca das alterações endógenas induzidas pela obesidade, e como essa condição pode prolongar ou até impedir a reparação dos tecidos.

### **2.1.1. TECIDO ADIPOSEO**

O tecido adiposo (TA) é de origem mesodérmica e contém uma população celular estromal heterogênea. Anterior aos anos 80, ele era apenas considerado um reservatório metabólico para liberação de triglicérides e colesterol, no entanto, esse conceito foi modificado a partir da identificação da sua atuação na fisiologia sexual por meio dos esteróides sexuais (GAIBA et al., 2012). Hoje ele é reconhecido como órgão endócrino complexo que desempenha um papel central na homeostase energética, alimentar, sensibilidade à insulina, e na inflamação (BASSI et al., 2012; MITTERBERGER et al., 2012; HUTTALA et al., 2015), é a maior reserva de energia do corpo, possui enorme plasticidade durante toda a vida (GAIBA et al., 2012), com as

funções de fornecer rigidez e resistência aos tecidos, manter a homeostase térmica e auxiliar na estática visceral (ZUTTON et al, 2013).

O tecido adiposo é constituído principalmente por adipócitos, pré-adipócitos livres de lipídeo, células endoteliais (GAIBA et al., 2012) e células-tronco (BASSI et al., 2012). Os adipócitos são as únicas células especializadas e perfeitamente adaptadas para armazenar lipídeos sem que isso comprometa a sua integridade funcional (LEE, WU & FRIED, 2010; GAIBA et al., 2012). Quando o balanço energético é positivo, calorias adicionais são armazenadas na forma de triacilglicerol, que é conseguido pelo alargamento dos adipócitos, bem como através de recrutamento de células progenitoras para formar mais adipócitos (GAIBA et al., 2012; HUTTALA et al., 2015).

Em seres humanos adultos, aproximadamente, 10% da gordura depositada em células adiposas são renovados anualmente. Isto indica uma demanda elevada de células progenitoras para a renovação e, por conseguinte, manutenção das funções dos tecidos adiposos (MITTERBERGER et al., 2012).

Novos adipócitos são formados através da adipogênese, tipicamente descrita como um processo de duas fases: comprometimento e diferenciação terminal. Numa fase chamada de determinação, células-tronco se transformam em pré-adipócitos; a fase de comprometimento dá-se pela suspensão do crescimento após uma combinação de sinais adipogênicos e mitogênicos necessários para a diferenciação terminal; na diferenciação terminal, pré-adipócitos tornam-se sensíveis à insulina, sintetizam lipídeos e transportam adipócitos maduros (MITTERBERGER et al., 2012; HUTTALA et al., 2015).

O tecido adiposo é dividido em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Ambos apresentam estruturas celulares, localizações, cores, e funções fisiológicas diferentes (ZUTTON et al, 2013). O tecido adiposo branco (TAB) se distribui no organismo como tecido adiposo branco subcutâneo e tecido adiposo branco visceral, consistindo em adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais, monócitos e macrófagos residentes e linfócitos (ZUTTON et al, 2013; MIYATA et al., 2016). O tecido adiposo marrom (TAM) possui adipócitos com várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos e um grande número de mitocôndrias que são responsáveis pela liberação de calor na regulação termogênica (MEDINA-GOMEZ, 2012; ZUTTON et al, 2013). Em mamíferos, o tipo de tecido adiposo predominante é o branco, em comparação ao tecido adiposo marrom, que é presente em recém-nascidos, mas praticamente ausente em adultos (ZUTTON et al, 2013).

O TAB em adultos tem capacidade de expandir-se e encolher por toda a vida de um indivíduo, esta capacidade é mediada pela presença de células vasculares e não vasculares que fornecem um pool de células progenitoras e células-tronco com potencial de regeneração (MITTERBERGER et al., 2012; ZIMMERMANN, 2015).

O acúmulo de gordura e disfunções no tecido branco visceral causa anormalidades em toda homeostase metabólica do corpo, resultando em distúrbios que ameaçam a vida, como a obesidade (MIYATA et al., 2016). Por conta da participação na fisiologia dos mamíferos e, a sua importância como fonte de energia na produção de hormônios, a busca pelo conhecimento atualmente dá-se em torno das funções do tecido adiposo branco (KERSHAW & FLIER, 2004).

Nos últimos 20 anos foi dada grande importância ao papel endócrino do tecido adiposo, em decorrência de estudos mostrando uma ampla gama de proteínas secretadas, denominadas adipocinas (GAIBA, 2012; KAMIMURA et al, 2012; BERTASO et al., 2013). Este fato consolida a ideia de que este tecido não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas também um órgão dinâmico e endócrino.

Dos hormônios produzidos pelos adipócitos, destacam-se a leptina e a adiponectina. A leptina é um produto do gene da obesidade, atua como regulador de energia, inibe a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (KERSHAW & FLIER, 2004; YOUSSEF et al, 2013; UZEDA E SILVA et al., 2016). Já a adiponectina é o peptídeo mais abundante produzido pelo tecido adiposo, esta tem papel regulador da sensibilidade à ação da insulina, além de suas propriedades antiaterogênica, anti-inflamatória e cardioprotetora (SPENER et al., 2011; KAMIMURA et al, 2012; BERTASO et al., 2013). A adiponectina é expressa e secretada exclusivamente por adipócitos maduros; por conta disso, é usada também como um marcador específico de adipócitos maduros (MIYATA et al., 2016).

A leptina circulante se correlaciona positivamente com o percentual de gordura corpórea e com a massa de gordura corpórea (ROSINI et al., 2012; YOUSSEF et al, 2013), diferente da adiponectina, que embora a sua síntese ocorra exclusivamente no tecido adiposo, a sua relação com a gordura corporal total é inversa (KAMIMURA et al, 2012; BERTASO et al., 2013); por isso, manter o equilíbrio na quantidade adequada de tecido adiposo é essencial à saúde, já que níveis fora do normal levam ao desequilíbrio na produção de adipocinas e consequências adversas. Como resultado, o baixo TA leva a anorexia e caquexia, e muito TA leva à obesidade ou a uma distribuição anormal de tecido adiposo (lipodistrofia) (WOOD et al., 2009).

A obesidade é caracterizada como um estado de inflamação crônica de baixo grau (SARTORI-CINTRA et al., 2013; YOUSSEF et al, 2013; UZEDA E SILVA et al., 2016), que foi sugerida quando níveis elevados de adipocinas pró-inflamatórias, como a TNF- $\alpha$ , a interleucina 6 (IL-6) circulatória, interleucina 1 $\beta$ , resistina, leptina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foram observadas em obesos (SARTORI-CINTRA et al., 2013; UZEDA E SILVA et al., 2016). Algumas destas citocinas pró-inflamatórias também são reconhecidas como adipocinas e encontram-se elevadas em obesos. Essas são necessárias para a diferenciação celular e hematopoiese, contudo, tais funções dependem de sua concentração na circulação sanguínea e, a “super” elevação já é capaz de dar início ao processo inflamatório de baixo grau (SARTORI-CINTRA et al., 2013)

As adipocinas atingem o hipotálamo e interferem na sua regulação do controle da fome e gasto energético. Dessa maneira, a pessoa ingere mais alimentos, com consequente aumento do peso e do tecido adiposo, o qual libera mais leptina. Esse desajuste torna o hipotálamo resistente aos hormônios periféricos insulina e a própria leptina, a qual, em concentrações elevadas assume características de cunho inflamatório (SARTORI-CINTRA et al., 2013)

YE et al. (2007) perceberam que na obesidade existe uma hipóxia no tecido adiposo, sugerindo ser esta, a contribuição para o estado de inflamação crônica nos obesos. Em indivíduos obesos, os adipócitos podem chegar a cerca de 150-200  $\mu$ m, ultrapassando a distância normal de difusão do O<sub>2</sub> (WOD et al, 2009); essa hipertrofia celular reduz o fluxo da vascularização no tecido adiposo branco, e o torna mal vascularizado (YE et al, 2007; WOD et al, 2009). O adipócito também sofre diminuição da oxigenação, sendo a consequência metabólica, a geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas para degradar subunidades do citocromo c oxidase, responsável pela produção de energia (WOOD et al., 2009).

A presença do macrófago ao redor do tecido adiposo em obesos sugere que, a obesidade, ao induzir a necrose dos adipócitos por estresse celular, promove o recrutamento e ativação deste componente celular no TAB (UZEDA E SILVA et al., 2016). Sendo este uma fonte de liberação de citocinas pró- inflamatórias, justificaria o potencial de prolongamento da fase inflamatória do reparo tecidual.

O aumento do consumo de alimentos ricos em gordura saturada é um fator de importância na perpetuação do quadro inflamatório em obesos. Os ácidos graxos saturados contribuem para a resistência hipotalâmica à leptina e insulina, já que eles ativam os receptores do sistema imune, integrado ao sistema metabólico. Uma vez

ativados, um processo infeccioso é simulado, desencadeando uma resposta inflamatória; assim, a inflamação de baixo grau instalada, é auto-limitada pela presença de citocinas produzidas e liberadas pelo próprio tecido adiposo (SARTORI-CINTRA et al., 2013).

## **2.2. REPARO TECIDUAL**

O processo de cicatrização de feridas segue uma sequência de eventos fisiológicos objetivando a homeostasia do tecido (LINS et al., 2010; SANTUZZI et al., 2011; OLIVEIRA e DIAS, 2012; RUH et al., 2013). Essa sequência é caracterizada por: hemostasia, inflamação, proliferação (VIEIRA ROCHA et al., 2012), amadurecimento/remodelamento e reconstrução/digestão (LINS et al., 2010; OLIVEIRA e DIAS, 2012; VIEIRA ROCHA et al., 2012; RUH et al., 2013).

Quando ocorre uma lesão tecidual, o processo de reparo desencadeia uma série de eventos bioquímicos envolvendo células inflamatórias, células da borda da lesão e por uma rede de citocinas e de fatores de crescimento que influenciam a migração, a proliferação e a diferenciação das células (CRUSE et al., 2002; PIVA et al., 2011; SANTUZZI et al., 2011; VIEIRA ROCHA et al., 2012; ANDRADE et al., 2014). Logo após a lesão, o rompimento vascular concomitante ao alto consumo de oxigênio necessário para as atividades celulares, deixam o microambiente da ferida com baixos níveis de oxigênio (PIVA et al., 2011; SANTUZZI et al., 2011).

Segundo Oliveira e Dias (2012), a fase da hemostasia depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, tendo início imediatamente após o surgimento da ferida; a fase inflamatória é caracterizada pela presença de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares –PMN-, macrófagos e linfócitos); logo depois ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio com formação do tecido de granulação, proliferação endotelial e de fibroblastos (CRUSE et al., 2002); após três ou quatro dias, um tecido de granulação é produzido como um processo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina e fibronectina e a reestruturação de colágeno, a partir deste evento, inicia-se a fase de contração das paredes marginais da lesão realizada pelos fibroblastos diferenciados em miofibroblastos (CRUSE et al., 2002). Na última fase da cicatrização, os elementos reparadores são transformados em tecido maduro de características bem diferenciadas

A síntese e liberação de citocinas inflamatórias são essenciais para o reparo tecidual (SANTUZZI et al., 2011; OLIVEIRA e DIAS, 2012; VIEIRA ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; RUH et al., 2013), no entanto, em feridas crônicas, são



encontradas quantidades excessivas que retardam o processo de cicatrização (UZEDA E SILVA et al., 2016).

O Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória responsável por regular a ativação de metaloproteinases (MMPs) na pele, seus efeitos são dependentes da sua concentração, ou seja, em baixos níveis ela pode promover a cicatrização de feridas por estimular a inflamação e aumentar a produção de fatores de crescimento pelos macrófagos (RUH et al., 2013). Por conta disso, segundo Uzeda E Silva (2016), como elas são encontradas em níveis elevados em feridas crônicas, a ativação de MMPs pelo TNF- $\alpha$ , sugere o mecanismo pelo qual o prolongamento da fase inflamatória pode prejudicar a cicatrização normal.

A cicatriz é caracterizada por fibroblastos e uma matriz extracelular desorganizada, formada principalmente por colágeno (LINS et al., 2010; RUH et al., 2013). A síntese de fibras colágenas é um evento contínuo que se estende até o final do processo de reparo enquanto ocorre a remodelação tecidual (LINS et al., 2010; PIVA et al., 2011).

Mesmo com o ambiente hipóxico no início da cicatrização, as células endoteliais e fibroblastos ainda funcionam promovendo migração, síntese de proteínas e proliferação. Enquanto as fases prosseguem, os níveis de oxigênio normalizam gradualmente através da neoformação vascular. Conclui-se, então, que, o estado de oxigenação em que o tecido se encontra, desempenha um papel importante como estímulo precoce para o reparo do tecido (UZEDA E SILVA et al., 2016).

### **2.2.1. REPARO TECIDUAL E LASERTERAPIA**

Quando o processo de cicatrização é comprometido por condições locais ou sistêmicas, novos recursos terapêuticos surgem na tentativa de reduzir ou minimizar as falhas no processo de reparo tecidual, portanto, a laserterapia tem sido administrada com o objetivo de modular e acelerar o reparo tecidual, melhorando as características do tecido neoformado, principalmente no comprimento de onda vermelho e infravermelho próximo (LINS et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014).

A terapia com laser promove ativação precoce da fase inflamatória do processo de reparo tecidual, causando exacerbação dos sinais da mesma. Esta ativação ocorre devido à neoformação vascular durante o reparo (PIVA et al., 2011).

Os efeitos biomodulatórios da técnica sobre o tecido são responsáveis pelo aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos (MOREIRA et al., 2011; PIVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014), diminuição do infiltrado inflamatório (PIVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et

al., 2013; ANDRADE et al., 2014), angiogênese (LINS et al., 2010), aumento da motilidade de células epiteliais (ANDRADE et al., 2014); além de ser um método não-invasivo, não-farmacológico e com baixo índice de efeitos colaterais (PIVA et al. 2011; ROCHA et al., 2012; CHAGAS JUNIOR et al., 2013). Em tecido cuja cicatrização é prejudicada por alguma condição, como por exemplo, a obesidade, a qual leva à isquemia interferindo no reparo da lesão, o uso da luz laser é altamente indicada (UZEDA E SILVA et al., 2016).

O favorecimento do reparo cicatricial será importante na redução da morbidade pós-cirúrgica de indivíduos obesos, com redução dos custos dos atendimentos ambulatoriais e hospitalares, antecipação do retorno dos indivíduos às suas atividades sociais e laborais (UZEDA E SILVA et al., 2016), além da diminuição dos riscos de infecção (PIVA et al., 2011). Apesar da literatura ainda carecer de estudos envolvendo a fototerapia a laser na presença de desordens sistêmicas como a obesidade, já existem evidências da ação fotobiomodulatória destas fototerapias no reparo cicatricial de modelos animais normais ou com outras disfunções sistêmicas, como em ratos diabéticos, desnutridos (PINHEIRO et al., 2005; PINHEIRO et al., 2006) e hipotireoidianos (PARAGUASSÚ et al., 2013).

### **2.3. CÉLULAS-TRONCO**

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas, não especializadas, autorrenováveis e com potencial de diferenciação em células especializadas de um tecido específico, como células musculares, hemácias e neurônios (INÁCIO, 2011; ROCHA, 2011; GAIBA, 2012; ALVES, 2014).

Estas células podem ser encontradas em embriões recém-fecundados, células germinativas, células do sangue do cordão umbilical, tecidos adultos e, em células do tecido adulto a serem reprogramadas com comportamento não especializado, as quais são classificadas em três grandes grupos: células-tronco adultas ou somáticas (CTA); células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco pluripotentes induzidas (CTPI) (ALVES, 2014; GEORGES, 2014; TRUMBULL et al., 2016).

Células-tronco são células imaturas e não especializadas que fornecem uma fonte de células para regeneração de tecidos ou para substituir danificado, em falta ou deficiência de tecidos ou órgãos (FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016).

De acordo com o poder de diferenciação celular (também conhecido como plasticidade), as células-tronco são classificadas em: totipotentes - células progenitoras que possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos de células dentro de uma única

linhagem; pluripotentes - células que possuem o potencial de se diferenciar em células dos três tipos do folheto embrionário (endoderme, mesoderme, ectoderme); multipotentes - células adultas que possuem o potencial de se diferenciar em tipos específicos de outros tipos de células; e unipotentes - células que possuem a capacidade de se diferenciar em somente um tipo de célula (GEORGES, 2014).

As CTA apresentam uma capacidade mais restrita de diferenciação e são consideradas multipotentes (ALVES, 2014; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016). Estas células asseguram o balanço fisiológico no organismo, pois quando as células nos tecidos naturalmente expiram ou, o tecido torna-se comprometido e/ou danificado, as CTAs podem ser eficientemente recrutadas para a regeneração, reparo ou expansão (WAGNER et al., 2009; INÁCIO, 2011; ROCHA, 2011; GAIBA et al., 2012). Não apresentam problemas éticos, já que podem ser obtidas de tecidos adultos e podem ser transplantadas de forma autóloga, contudo, diferente das células tronco de pluripotência induzida, apresentam baixo potencial teratogênico, fazendo delas ferramentas atraentes para terapia celular (INÁCIO, 2011; GAIBA et al., 2012; ALVES, 2014; HIGUCHI et al., 2015).

Entre as diferentes populações de CTA estão as chamadas células-tronco mesenquimais (CTM). Este termo foi usado pela primeira vez para se referir a um hipotético precursor pós-natal, multipotente de população heterogênea e alto poder regenerativo derivado a partir de uma CTM embrionária inicial. CTMs possuem morfologia fibroblastóide e formam colônias em cultura capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodermal como osteócitos, adipócitos, condrócitos (INÁCIO, 2011; ALVES, 2014) e tendões (TRUMBULL et al., 2016), revelando alto índice de plasticidade.

A diferenciação destas células em diferentes linhagens é guiada pela matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e as interações célula-célula (KUSHIBIKI et al., 2015; PARK et al., 2015).

Em humanos, CTM foram identificadas em vários tecidos, no indivíduo adulto (medula óssea, sangue, tecido adiposo, pele, dente decíduo, músculo esquelético), como no feto (líquido amniótico, placenta) (ALVES, 2014; ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015). Porém, as derivadas da medula óssea e tecido adiposo são as mais utilizadas nas pesquisas de engenharia tecidual (TRUMBULL et al., 2016).

A alta plasticidade CTMs sugere que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (INÁCIO, 2011). Seu fácil isolamento e cultura, alto potencial expansivo, atividades imunossupressoras e, imunogenicidade limitada fazem destas células uma ferramenta terapêutica promissora

para as terapias celular e gênica da Medicina regenerativa atual (INÁCIO, 2011; ABRAHAMSE, 2012; ALVES, 2014; ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; FEKRAZAD<sup>a</sup> et al., 2016), bem como, podem ser usadas para transplantes autólogos (em um mesmo organismo) e heterólogos (entre organismos de espécies diferentes) (ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015).

CTMs são reconhecidas pela capacidade de autorrenovação, viabilidade a longo prazo e potencial de multilinhagens (FEKRAZAD<sup>a</sup> et al., 2016; FEKRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016; SULLIVAN et al., 2016). Demonstraram ter a capacidade de regenerar tecido ósseo, cartilagem, músculo, tendão, ligamento, tecido adiposo, e estroma. Após a coleta, essas células podem ser cultivadas de forma homogênea com biomarcadores que podem mudar ao longo do tempo e dependentes das condições da cultura (SULLIVAN et al., 2016).

Utilização de células-tronco com potencial regenerativo emergiram recentemente como uma nova forma de terapia para o tratamento de várias doenças e cicatrização de feridas (ABRAHAMSE, 2012; ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; KUSHIBIKI et al., 2015; KIM et al., 2016). As multipotentes possuem a capacidade de autorrenovação, essas são consideradas para tratar feridas estimulando processos angiogênicos (O'CEARBHAILL et al., 2010; BUSSER et al., 2015; KIM et al., 2016); no entanto, os mecanismos exatos permanecem desconhecidos (BUSSER et al., 2015; KIM et al., 2016).

Os fatores de crescimento e citocinas secretados por células-tronco mesenquimais podem ser administrados às feridas por transplante de células ou, como alternativa mais segura, usando o meio condicionado de CTM contendo moléculas bioativas secretadas. Em busca da diminuição do tempo de fechamento da ferida, a utilização de um CTMs é uma alternativa promissora para o tratamento de feridas crônicas (HENDUDARI et al., 2016).

Os efeitos parácrinos gerados pelas CTM são diversos: anti-apoptóticos, angiogênicos, de apoio ao crescimento e diferenciação de CT locais e células progenitoras, antifibrótico, imunomodulatório e quimiotático (DA SILVA e NARDI, 2009).

### **2.3.1. CÉULAS TRONCO DO TECIDO ADIPOSO**

O tecido adiposo (TA) representa atualmente uma fonte alternativa rica na obtenção de células-tronco mesenquimais devido à grande concentração destas células, com alta capacidade proliferativa e de diferenciação (ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; HIGUCHI et al., 2015; HUTTALA et al., 2015), o que faz aumentar as opções para a sua

aplicabilidade na engenharia e regeneração tecidual (INÁCIO, 2011; TISSIANI et al., 2012; HUTTALA et al., 2015).

Após a identificação do pré-adipócito, em 1926, diversos estudos experimentais demonstraram a capacidade dos precursores adipocitários em formar tecido adiposo maduro (CIGNARELLI et al., 2012; TISSIANI et al., 2012). Zuk e cols. (2001) isolaram do tecido adiposo uma população celular com capacidade de diferenciação pluripotente, semelhante à das células-tronco mesenquimais encontradas na medula óssea; a essas células deu-se o nome de células-tronco adipoderivadas (CTAD).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo são multipotentes e podem diferenciar-se, *in vitro*, em múltiplas linhagens mesenquimais, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células neuronais, células endoteliais e cardiomiócitos (INÁCIO, 2011; BASSI et al., 2012; CIGNARELLI et al., 2012; GAIBA et al., 2012; PARK et al., 2015; ZIMMERMANN, 2015), como em tecidos de linhagem não mesenquimal, como nervos e vasos sanguíneos, fenômeno este definido como transdiferenciação (INÁCIO, 2011; OLIVEIRA et al., 2013; ZIMMERMANN, 2015).

Dentre as células-tronco adultas, as derivadas do tecido adiposo são melhor alternativa perante às derivadas da medula óssea devido à facilidade de cultura, precisão do seu potencial de diferenciação, acessibilidade, além da população de células isoladas do tecido adiposo ser maior que da medula óssea (CIGNARELLI et al., 2012; SULLIVAN et al., 2016; TRUMBULL et al., 2016).

Células da fração vascular do estroma adiposo incluem as células que podem se diferenciar em adipócitos em um meio de cultura *in vitro* (CIGNARELLI et al., 2012; MIYATA et al., 2016), e estas são as células mais utilizadas nos estudos, mais especificamente aquelas provenientes do tecido TAB visceral, pois apresentam maiores proporções de células com potencial adipogênico, em relação ao TAB subcutâneo (MIYATA et al., 2016). Tem sido demonstrado que uma única célula aderente derivada da fração vascular do estroma adiposo pode ser ampliada gerando uma população de células filhas com capacidade de diferenciação multipotentes, definindo-as como células-tronco adultas (MITTERBERGER et al., 2012)

Estudos afirmam que CTDA inibem a proliferação e suprimem as funções de células B, além de reduzirem a produção de imunoglobulina; são também investigadas atualmente por suas propriedades de regulação dos sistemas metabólico através da modulação da adipogênese e lipogênese (CIGNARELLI et al., 2012) e imunológico em doença do enxerto versus hospedeiro e distúrbios auto-imunes (artrite reumatóide, doença de Crohn e colite ulcerosa) (BASSI et al., 2012; CIGNARELLI et al., 2012); reparação de

feridas, anti -envelhecimento, tratamento de defeito ósseo e fístulas (CIGNARELLI et al., 2012; MIN et al., 2015). A característica sugerida de favorecer o crescimento de células tumorais permanece ainda sob intenso debate, assim como sua capacidade de migrar para dentro de tumores, o que seria de grande utilidade para confecção de fármacos (BASSI et al., 2012). CTAD possuem vasta variação de aplicações clínicas, com úlceras crônicas ou diabéticas (KIM et al., 2016).

A proliferação e diferenciação das CTMs durante a cultura *in vitro* podem diferir das características naturais que estas células têm *in vivo* (CIGNARELLI et al., 2012; BUSSE et al., 2015). Para aplicações em engenharia de tecidos, é fundamental começar com uma população de células bem definidas, incluindo sua funcionalidade bem caracterizada. Conseguir isso permitirá a padronização de protocolos clínicos eficientes e seguros (BUSSE et al., 2015).

Existe um esforço para descobrir a origem e localização das células-tronco adiposas. Já é sabido que os adipócitos desenvolvem-se em coordenação com a vasculatura e, foi sugerido que seus progenitores residam nos vasos sanguíneos adiposos, e de mais nenhum outro tecido. Assim, a vasculatura do tecido adiposo parece funcionar como um nicho progenitor e pode fornecer sinais para o desenvolvimento dos adipócitos (CIGNARELLI et al., 2012).

Existem diferenças potenciais de células-tronco adiposas entre indivíduos normais e obesos que poderiam apoiar a hipótese de que a distribuição de gordura e a própria obesidade pode ter uma origem de desenvolvimento genética (CIGNARELLI et al., 2012).

Não existe um marcador específico para as células-tronco mesenquimais, o que invalida a identificação destas células por anticorpos específicos (BASSI et al., 2012; GAIBA et al., 2012; MITTERBERGER et al., 2012; BUSSE et al., 2015); em vez disso, vários marcadores são usados em conjunto para identificar essas células (BASSI et al., 2012; GAIBA et al., 2012; ALVES, 2014). No entanto, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs critérios mínimos para definir CTMs em 2006 (DOMINICI et al., 2006): essas são células semelhantes a fibroblastos em condições de cultura padrão, devem possuir adaptação plástica; devem possuir potencial de diferenciação multipotente; e devem ser positivas para marcadores de superfície mesenquimais (CD105, CD73 e CD90) e sem expressão de marcadores endoteliais hematopoiéticos (CD45, CD34, CD14, CD11b ou, CD79a ou CD19, e HLA-DR).

Sullivan e cols. (2016) encontraram uma taxa de 90% de células-tronco com biomarcadores CD90+, CD44+ e CD45- coletadas do tecido adiposo do ligamento

falciforme de cães, apesar destes serem marcadores característicos de células-tronco derivadas da medula óssea, segundo os autores.

Park e cols. (2015) utilizaram células-tronco derivadas do tecido adiposo para caracterizar os marcadores celulares humanos. O resultado deu positivo para CD29, CD90 e CD105.

Busser e cols. (2015) encontraram em seu estudo, por citometria de fluxo, que células-tronco derivadas do tecido adiposo são positivas para o marcador CD34, porém negativas para CD44.

Existem algumas diferenças na expressão de marcadores particulares entre as CTMs (BASSI et al., 2012; CIGNARELLI et al., 2012; BUSSE et al., 2015). Células-tronco derivadas do tecido adiposo expressam CD49d, o que não ocorre com as da medula óssea, enquanto estas expressam CD106, mas não as do tecido adiposo (INÁCIO, 2011; BASSI et al., 2012; CIGNARELLI et al., 2012). Alguns marcadores são normalmente expressos por CTAD, tais como CD 105, CD90, CD34, (BASSI et al., 2012; MITTERBERGER et al., 2012; HIGUCHI et al., 2015), CD13, CD29, CD54, CD73, MHC I (BASSI et al., 2012), CD207 (ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015) e CD166 (HIGUCHI et al., 2015). No entanto, é extremamente difícil obter CTADs que expressam todos os marcadores de superfície com mais do que 90% de pureza. Na maioria dos casos, a primeira passagem tem sido cerca de 60-80% positivo para estes marcadores, indicando que CTADs não formam populações homogêneas (HIGUCHI et al., 2015). Vale ressaltar que, a combinação de marcadores não pode distinguir CTADs com alta ou baixa capacidade adipogênica (MITTERBERGER et al., 2012).

CD49 são moléculas de adesão celular pertencentes à subfamília  $\beta 1$  das L-selectinas, as quais são expressas em leucócitos e parecem estar envolvidas na adesão leucocitária ao endotélio durante o processo de transmigração do vaso ao tecido em processo inflamatório (CRUSE et al., 2002; BRADAWY et al., 2013).

Já foram apresentadas provas de que a imunofenotipagem da CTDA pode mudar durante a expansão em cultura da célula, provavelmente influenciado pela aderência plástica da cultura, e proliferação em meio com concentrações elevadas de soro fetal bovino (SFB), o qual contém fatores variáveis e indefinidos que influenciam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células-tronco adultas (MITTERBERGER et al., 2012).

O estudo promovido por Higuchi e cols. (2015) corroborou com a afirmação de Mitterberger e cols. (2012) em relação à sensibilidade da expressão dos marcadores

de superfície ao meio que as células são expostas, já que seus resultados indicaram que CTADs purificadas utilizando o método de migração da membrana híbrida expressam níveis muito mais elevados de marcadores de superfície em cada célula do que CTADs purificadas utilizando o método de cultura convencional, como as células do estroma vascular.

Um método adequado de seleção permitiria o emprego de CTMs em diferentes patologias diretamente após o seu isolamento ou sua expansão *in vitro*. Marcadores de identificação pré-cultura garantiriam um grau de pureza mais elevado do que o obtido com uma seleção baseada na aderência plástica. Muitos pesquisadores direcionam seus esforços em encontrar um marcador ou uma combinação de marcadores para garantir a sua seleção (ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015).

Mitterberger e cols. (2012) detectaram diferenças na intensidade da maturação adipogênica no nível individual de CTDA isolada a partir de uma mesma cultura. Estes dados sugerem que pode existir heterogeneidade em relação à capacidade adipogênica de células-tronco de uma mesma cultura.

#### **2.4. LASER**

Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation é representada pela sigla LASER, convencionada para definir uma radiação eletromagnética não ionizante, altamente concentrada, produzida por emissão espontânea (LINS et al., 2010; SANTUZZI et al., 2011; ANDRADE et al., 2014; FREITAS et al., 2014). Propriedades únicas a diferenciam de outras fontes de luz, tais como, monocromaticidade, coerência e colimação (HENRIQUES et al., 2008; ANDRADE et al., 2014).

Pinheiro e cols. (2010) discriminam as propriedades individuais da luz laser como monocromática ou pura; coerente, pois as cristas das ondas encontram-se pareadas e unidirecionais; e colimada, o foco da luz pode ser mantido mesmo com o aumento da distância focal devido ao grau de paralelismo entre as ondas.

Pensava-se que a coerência fosse imprescindível para a ação do laser no tecido (FREITAS et al., 2014), porém, na década de 80, após a comparação entre o efeito sobre o crescimento celular utilizando fontes de luz coerente e incoerente, sugeriu-se que essa propriedade não é importante para o efeito biológico do laser, já que o efeito estimulante na síntese do DNA ocorreu independente da coerência da luz utilizada (PARAGUASSÚ et al., 2013; FREITAS et al., 2014).

Os primeiros efeitos biológicos da luz laser foram descobertos por Endre Mester em 1966. Desde então, pesquisadores levantam os benefícios da radiação laser em



terapias médicas devido a sua capacidade de penetrar nos tecidos (HENRIQUES et al., 2008; KUSHIBIKI et al., 2015). Os lasers de baixa potência possuem finalidade terapêutica, atuam como antiinflamatório, analgésico e biomodulador (FIGUEIREDO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; FREITAS et al., 2014), com atuação a nível celular e dependente de variáveis, como dose, ponto de irradiação, número de sessões e comprimento de onda utilizado (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005; HENRIQUES et al., 2008; FREITAS et al., 2014; GINANI et al., 2014).

Os Lasers em utilização prática apresentam duas classificações, alta potência ou cirúrgicos e baixa potência ou terapêuticos. Como o nome já diz, os primeiros são indicados para procedimentos cirúrgicos, pois permitem o corte, vaporização e coagulação dos tecidos (LINS et al., 2010; ANDRADE et al., 2014); já os de baixa potência, são os responsáveis pelos efeitos antiinflamatórios e biomoduladores no tecido (LINS et al., 2010; SANTUZZI et al., 2011; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2013; FREITAS et al., 2014).

Os aparelhos de laser são dispositivos compostos por substâncias gasosas ou de pedras preciosas que geram luz quando excitadas por uma fonte de energia (HENRIQUES et al., 2008). Para pesquisas sobre o uso da luz laser no processo de cicatrização tecidual já foram citados lasers de rubi, hélio-neônio, arsênio-gálio, arsênio-gálio-alumínio (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005.). De acordo com Bourguignon-Filho e cols. (2005), os lasers que utilizam essas fontes possuem sucesso no processo de cicatrização de feridas em tecidos moles, com pouca significância em reparos ósseos.

A fototerapia laser já possui eficácia em diversas especialidades odontológicas, com uso na prevenção e tratamento da mucosite oral (DE CASTRO et al., 2013; SILVA et al., 2014; BASSO et al., 2015; OTON-LEITE et al., 2015), preparo cavitário e acesso endodôntico (SOUZA et al., 2011; TAMBOGA et al., 2011), reparo ósseo (OLIVEIRA et al., 2011); terapia fotodinâmica (MATTIELLO et al., 2011) e, aceleração e analgesia do movimento ortodôntico (BARBOSA et al., 2013). Embora, muitos protocolos ainda levantem a necessidade de mais pesquisas na área.

#### **2.4.1. LASERTERAPIA**

A terapia com laser de baixa intensidade já mostrou-se eficaz em vários campos clínicos, com relatos sobre o efeito da atenuação da dor, reparação de feridas, remodelação óssea, rejuvenescimento da pele, aumento da vascularização sanguínea local e tratamento de doenças inflamatórias da pele (KUSHIBIKI et al., 2015; MIN et al., 2015; PARK et al., 2015; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016).

A cicatrização de uma forma estética e satisfatória sempre foi uma preocupação médica para atender as expectativas dos seus pacientes. Assim, a inclusão da fototerapia a laser ou fotobioestimulação, tem sido difundida na literatura pela sua principal capacidade de modular a resposta inflamatória e acelerar o reparo tecidual através da proliferação celular (LINS et al., 2010; ABRAHAMSE, 2012; GINANI, 2014; CAVALCANTI et al., 2015; OTON-LEITE et al., 2015; ZACCARA et al., 2015).

A luz pode interagir com o tecido de quatro maneiras: transmissão, reflexão, dispersão e absorção (PINHEIRO et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2013).

#### 1) TRANSMISSÃO

A luz passa pelo tecido mas não causa nenhum efeito sobre ele

#### 2) REFLEXÃO

A luz é refletida e não penetra no tecido

#### 3) DISPERSÃO

A luz é espalhada dentro do tecido

#### 4) ABSORÇÃO

Os cromóforos são biomoléculas capazes de absorver os fótons emitidos pela luz laser convertendo-os em energia metabólica no tecido (GINANI et al., 2014; KUSHIBIKI et al., 2015; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016; HENDUDARI et al., 2016). Cromóforos ou fotorreceptores absorvem a fotoenergia intrinsecamente ou através de um componente molecular. A cadeia respiratória mitocondrial inclui múltiplos fotorreceptores: enzima citocromo c oxidase, porfirina, flavoproteínas, bilirrubina, melanina, vitaminas B6 e K, entre outros (KUSHIBIKI et al., 2015). Essas moléculas dependem, preferencialmente, do comprimento de onda (MEZZARANE, 2007; KUSHIBIKI et al., 2015). Melanina e hemoglobina são exemplos de cromóforos que absorvem o espectro na faixa do vermelho (MEZZARANE, 2007).

Os principais comprimentos de onda utilizados na laserterapia de baixa intensidade com benefícios significativos em modelos animais e processos patológicos em humanos, estão na faixa do vermelho (630 a 700nm) e infravermelho próximo (700 a 904nm) (BARBOZA et al., 2013; ABREU FREITAS et a., 2013; ANDRADE et al., 2014; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016). A profundidade de penetração da luz é diretamente proporcional ao comprimento de onda dentro do espectro visível, ou seja, tecidos mais superficiais são tratados com comprimentos de onda entre 600 e 700 nm, e tecidos mais

profundos utilizam comprimentos de onda mais longos, entre 780-950 nm (PINHEIRO et al., 2010; CHUNG et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2013).

O laser de baixa intensidade atua sem produzir efeitos tóxicos (HENDUDARI et al., 2016) e sem aquecer o tecido, ao invés disso, após a energia dos fótons ser absorvida, ela age nos processos moleculares e bioquímicos teciduais e induz reações fotoquímicas, fotofísicas e/ou fotobiológicas (LINS et al., 2010; DE CASTRO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2013; ABREU FREITAS et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015; MIN et al., 2015; FEKRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016). Recentemente, muitos estudos relataram que a laserterapia aprimora o crescimento e a proliferação de linhagens de células cultivadas, incluindo células-tronco (GINANI et al., 2014; MIN et al., 2015; PARK et al., 2015; ZACCARA et al., 2015; BLATT et al., 2016; FEKRAZAD<sup>a</sup> et al., 2016).

Embora alguns autores defendam que muito pouco é conhecido sobre a aplicação do laser de baixa potência sobre células-tronco (GINANI et al., 2014; ZACCARA et al., 2015; BLATT et al., 2016), tem sido mostrado na literatura que o laser de baixa potência induz a atividade de células-tronco pelo aumento da migração, proliferação e viabilidade, ativação da expressão de proteínas, e indução da diferenciação de células progenitoras (PARK et al., 2015; ZACCARA et al., 2015). Blatt e cols. (2016) afirmam que laserterapia *in vitro* em células-tronco mesenquimais causa significativo aumento na sua taxa de proliferação, assim como, a taxa de proliferação de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

Células-tronco mesenquimais da polpa dentária irradiadas no comprimento de onda vermelho e dose de 1J/cm<sup>2</sup> apresentaram aumento na sua taxa de proliferação (ZACCARA et al., 2015). Aplicação do laser de baixa potência a células progenitoras neurais humanas normais aumentou significativamente sua produção de trifosfato de adenosina (ATP) (BLATT et al., 2016).

Alguns aspectos da laserterapia podem influenciar os resultados desejados para proliferação celular, tais como o espectro de luz ideal, o nível de potência, densidade de energia e comprimento de onda (GINANI et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015; ZACCARA et al., 2015). Estudos recentes mostram que os melhores resultados são obtidos quando o espectro de luz visível (600 a 700 nm) é utilizado (CAVALCANTI et al., 2015; ZACCARA et al., 2015) para proliferação e viabilidade das CTMs. Em contraste, o espectro de luz infravermelho (810-830 nm) tem sido associado com a inibição da proliferação (ZACCARA et al., 2015).

De acordo com os resultados do estudo de Fekrazad<sup>a</sup> e cols. (2016), usando células-tronco derivadas da medula óssea de coelhos, a quantidade da formação de nova

cartilagem foi ligeiramente mais favorável quando aliadas à terapia laser do que com aplicação de células-tronco isoladas.

A ação fotobiológica do laser a nível celular ocorre através da ativação da cadeia respiratória da mitocôndria (LINS et al., 2010; DE CASTRO et al., 2013; ABREU FREITAS et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015; MIN et al., 2015; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016), estimulação da síntese de DNA e RNA, variação do pH intra e extracelular, aceleração do metabolismo, e aumento da produção protéica e modulação da atividade enzimática (BARBOZA et al., 2013; ABREU FREITAS et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). A excitação do fotorreceptor inicia uma cascata de atividades celulares, resultando em produção de ATP (PIVA et al., 2011; BARBOZA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015; KUSHIBIKI et al., 2015; MIN et al., 2015; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016). Pequenas mudanças no nível de ATP podem alterar significativamente o metabolismo celular, com isso, aumentar a quantidade dessa energia pode promover a melhora no metabolismo celular, especialmente nas células que estejam debilitadas (MEZZARANE, 2007; LINS et al., 2010).

A fotobiomodulação atua sobre diferentes tipos celulares e obtêm respostas diversificadas, a exemplo da proliferação epitelial e de fibroblastos, bem como a maturação, locomoção e transformação dos mesmos em miofibroblastos, produção de colágeno e elastina, angiogênese (BARBOZA et al., 2013; DE CASTRO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2013; ABREU FREITAS et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2015; HENDUDARI et al., 2016), revascularização, contração da ferida, aceleração do processo cicatricial (FIGUEIREDO et al., 2013; ABREU FREITAS et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015). Dados experimentais mostraram que a irradiação é seguida pelo aumento da síntese de fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), e espécies reativas de oxigênio (GINANI et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2015).

O efeito do laser depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação, portanto, se uma célula encontra-se em seu estado normal, não há estímulo para o efeito terapêutico do laser, porém, se uma célula está com algum déficit metabólico, o mecanismo de interação da luz com as células ou tecido pode tanto estimular quanto inibir certas funções celulares, com o resultado dependente da dose administrada (MEZZARANE, 2007; ABREU FREITAS et al., 2013).

A bioestimulação feita pela laserterapia aumenta consideravelmente a proliferação de fibroblastos e produção de colágeno em feridas irradiadas e, conseqüentemente,

acelera o processo de cicatrização (LINS et al., 2010; MOREIRA et al., 2011; PIVA et al., 2011; CHAGAS JUNIOR et al., 2013 ANDRADE et al., 2014). Para a regeneração celular, o efeito da luz deve ser a nível dos condroblastos e neuroblastos (FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016).

A diversidade dos parâmetros utilizados nos estudos (densidade de energia/dose, comprimentos de onda, potência, tempo de tratamento, tempo de irradiação, área do feixe, e número de pontos irradiados) afetam diretamente seus resultados (LINS et al., 2010; CHAGAS JUNIOR et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; FREITAS et al., 2014; GINANI et al., 2014; ZACCARA et al., 2015; FEGRAZAD<sup>b</sup> et al., 2016), por conta disso, Jenkins & Carroll (2011) sugeriram que os parâmetros relacionados ao aparelho e tratamento fossem citados pelos autores, pois estas informações ajudariam a evitar problemas causados pela informação incompleta dos dados, o que podiam tornar resultados impublicáveis.

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo que envolve uma série de eventos regulados por fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (ANDRADE et al., 2014; OTON-LEITE et al., 2015), por isso, os estudos que tem por objetivo testar a eficácia da irradiação laser dão preferência em utilizar modelos animais a culturas in vitro, já que esses são capazes de reproduzir fisiologicamente o processo, e assim, obter uma simulação mais realista do efeito da laserterapia sobre o tecido (UZEDA E SILVA et al., 2016). A facilidade de manipular roedores os tornam o modelo mais escolhido nas pesquisas científicas.

### **3. PROPOSIÇÃO**

#### Objetivo Geral

Avaliar, através de análise imunohistoquímica, o envolvimento de células-tronco do tecido adiposo no reparo de feridas cutâneas excisionais dorsais de ratos submetidos a dieta hiperlipídica e os efeitos da fototerapia Laser ( $\lambda 660\text{nm}$ ) com densidade de energia de  $6\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto.

#### Objetivos Específicos

1. Verificar o efeito da dieta hiperlipídica na lipogênese, através da análise do tecido adiposo retroperitoneal.
2. Avaliar a expressão protéica de marcadores das células-tronco adiposas CD49d em feridas de pele de ratos com e sem obesidade induzida nos tempos experimentais de 7 e 14 dias;
3. Avaliar a expressão protéica de marcadores de células-tronco-adiposas CD49d em feridas de pele pós fotobiomodulação laser em ratos com e sem obesidade induzida nos tempos experimentais de 7 e 14 dias.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA**

Este experimento em animais seguiu os princípios éticos e legais de conduta de experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), desta Instituição protocolo nº 02/12 (ANEXO), de acordo com a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

### **4.2 – AMOSTRA**

Foram utilizados 48 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, classe Mammalia, ordem Rodentia, da linhagem Wistar, desmamados e obtidos no Biotério Suprilab (Suprimento de Laboratórios e Biotérios) em Cachoeira/Ba. Os procedimentos e a manutenção dos ratos foram realizados no biotério de experimentação animal do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, contendo no máximo três ratos/gaiola, em local livre de ruídos, com condições normais de umidade, temperatura média de 23 °C e em ciclo de 12h de luz-escuridão. Cada gaiola foi forrada com maravalha, sendo substituída a cada 48 horas, propiciando, assim, condições favoráveis de higiene e preenchendo os requisitos físico-químicos para a saúde e bem-estar dos animais.

### **4.3 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS**

Após o período de desmame, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: os que foram alimentados com dieta padrão (DP) e os que foram alimentados com dieta hiperlipídica (DH), ad libitum, durante o período de 20 semanas. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro subgrupos, avaliados em dois tempos biológicos pós-operatórios (7 e 14 dias) de acordo com o tipo de dieta, protocolo de irradiação e tempo experimental (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição dos ratos nos grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta, protocolo de irradiação e tempo experimental.

TIPO DE DIETA	TRATAMENTO	TEMPO EXPERIMENTAL	NÚMERO DE ANIMAIS
Padrão	Controle (sem irradiação)	7 dias	6
		14 dias	6
	Irradiação Laser ( $\lambda$ 660nm, 24 J/cm <sup>2</sup> , 40mW, CW)	7 dias	6
		14 dias	6
Hiperlipídica	Controle (sem irradiação)	7 dias	6
		14 dias	6
	Irradiação Laser ( $\lambda$ 660nm, 24 J/cm <sup>2</sup> , 40mW, CW)	7 dias	6
		14 dias	6

#### 4.4 – MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL

O grupo DP foi alimentado com uma ração padrão (NUVILAB® - Nuvital Nutrientes S / A, Brasil). O grupo DH foi alimentado com uma dieta de cafeteria, rica em gordura, que foi iniciada no 22º dia depois do desmame. A ração hiperlipídica foi composta de alimentos que constituem as refeições básicas. Esta dieta contém 17% de proteína e um elevado teor de gordura (23%) (Tabela 1). Todos os ratos foram alimentados durante 20 semanas, continuando mesmo após o procedimento cirúrgico.



TABELA 1. Composição da dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH)

Componentes (%)	Dieta	
	DP	DH
Carboidratos (%)	57	46
Proteínas (%)	22	17
Gordura (%)	4	23
Energia (Kcal/g)	3,5	4,5

A dieta padrão (Nuvilab® CR1, Brasil) foi composta de milho integral moído, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, vitaminas e sais minerais. A dieta hiperlipídica previamente padronizada por Estadella et al. (2004) e analisada por Oliveira et al. (2011) foi composta de uma mistura da ração padrão (Nuvilab® CR1, Brasil), chocolate ao leite, amendoim torrado e biscoito maisena (Figura 1), na proporção de 3:2:2:1, seguindo a sequência citada, os ingredientes foram triturados, misturados e peletizados e, após a secagem em estufa, a dieta era oferecida aos ratos.



Figura 01 - Ração Hiperlipídica e Ração Padrão (UFBA, 2014).

#### 4.5 – AVALIAÇÃO PONDERAL

Os ratos foram pesados duas vezes por semana, desde a introdução da dieta até a finalização do experimento (Figura 2). Para isso foi utilizada uma balança digital (Filizola, MF-3) com capacidade máxima de 3000g e precisão de 0,5g. Após a morte dos ratos, foi feita uma incisão no abdômen, remoção de todas as vísceras, separação da

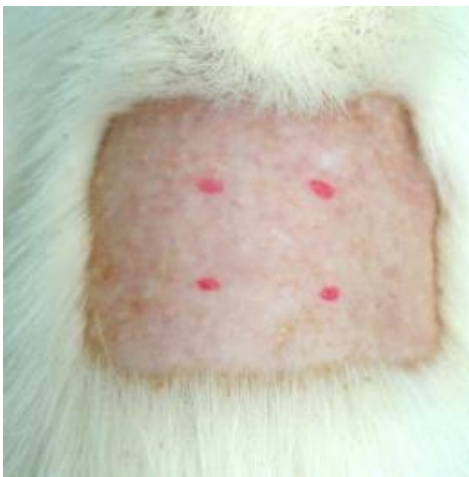
gordura retroperitoneal e pesagem para comparação da quantidade de tecido adiposo entre os grupos, e assim, constatar a obesidade nos animais do grupo DH.



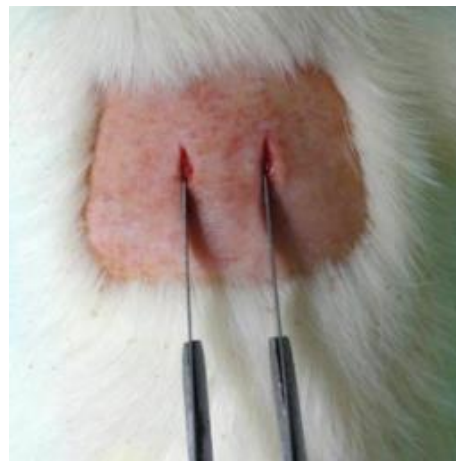
**Figura 02** - Ratos que receberam ração hiperlipídica e ração padrão (UFBA, 2014).

#### **4.6 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

Após o período de 20 semanas de indução da obesidade, os ratos foram submetidos à anestesia geral, com injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®) e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®) na posologia de 80mg/Kg e 14mg/Kg, respectivamente. Em seguida, com os ratos posicionados em decúbito ventral, foi realizada a tricotomia manual da região média do dorso e antissepsia da área cirúrgica com Digluconato de Clorexidina a 2%. Em todos os ratos foram confeccionadas feridas cutâneas excisionais padronizadas de 1cm x 1cm com auxílio de um bisturi modificado com lâminas de bisturi nº 15 e um gabarito padronizado de 1cm<sup>2</sup>. As feridas foram deixadas sem sutura para cicatrizar por segunda intenção. Após o procedimento cirúrgico, os ratos foram mantidos individualmente em suas respectivas gaiolas plásticas, devidamente identificadas de acordo com o grupo ao qual fazia parte, e mantidos em constante observação até a finalização do período experimental.



**Figura 03** - Demarcação dos pontos correspondentes aos ângulos da ferida cirúrgica (UFBA, 2014).



**Figura 04** - Incisão para confecção da ferida cirúrgica (UFBA, 2014)



**Figura 05** - Ferida cirúrgica imediatamente após a confecção (UFBA, 2014).

#### 4.7 – PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO

Para a irradiação dos grupos experimentais, foi utilizado o aparelho de Laser diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), (modelo *Twin Flex Evolution*, MMOptics®, São Carlos, SP) no comprimento de onda vermelho ( $\lambda 660\text{nm}$ ), com emissão de radiação contínua, potência de 40mW e área de saída do feixe da ponteira de  $0,04\text{cm}^2$ . O protocolo de irradiação nos grupos irradiados por laser DPL e DHL, por sessão, consistiu na aplicação da densidade de energia de  $24\text{J}/\text{cm}^2$ , sendo iniciada imediatamente após a confecção da ferida excisional, repetindo-as com intervalo de 48 horas, até a morte dos ratos (7 ou 14 dias pós-operatórios). A dose total de tratamento consistiu de  $96\text{J}/\text{cm}^2$  e  $168\text{J}/\text{cm}^2$ , ao final dos períodos experimentais de 7 e 14 dias, respectivamente. A irradiação com o laser foi realizada de forma pontual em quatro pontos correspondentes aos ângulos da ferida, o mais próximo de suas bordas. A ponteira do laser foi mantida

em posição perpendicular ao tecido irradiado, a fim de garantir maior absorção da energia. Em cada ponto foi depositada uma densidade de energia de 6J/cm<sup>2</sup> com o tempo de aplicação de 2 minutos e 30 segundos, totalizando 24J/cm<sup>2</sup> e um tempo de aplicação total de 10 minutos por sessão. Foi escolhido o comprimento de onda vermelho já que o processo de cicatrização ocorre nas camadas superficiais do tecido.

Quadro 2: Parâmetros utilizados no protocolo de irradiação (UFBA, 2014).

PARÂMETROS	DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA CONTROLE		DIETA PADRÃO E DIETA HIPERLIPÍDICA LASER	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Comprimento de onda (nm)	-	-	660nm	660nm
SAEF (J/cm <sup>2</sup> - sessão)	-	-	24J/cm <sup>2</sup>	24J/cm <sup>2</sup>
SAEF (J/cm <sup>2</sup> - tratamento)	-	-	96J/cm <sup>2</sup>	96J/cm <sup>2</sup>
Potência Output (mW)	-	-	40mW	40mW
Área do tecido iluminada (cm <sup>2</sup> )	-	-	1cm <sup>2</sup>	1cm <sup>2</sup>
Área do spot (cm <sup>2</sup> )	-	-	0,04cm <sup>2</sup>	0,04cm <sup>2</sup>
Irradiância (mW/cm <sup>2</sup> )	-	-	1000mW/cm <sup>2</sup>	1000mW/cm <sup>2</sup>
Tempo de irradiação (sessão)	-	-	10 min	10 min
Tempo de irradiação (tratamento)	-	-	40 min	70 min



**Figura 06** - Aparelho utilizado para realização da fototerapia laser (UFBA,2014).



**Figura 07** - Irradiação da ferida cirúrgica com a luz Laser de emissão vermelha (UFBA, 2014).

#### **4.8 – MORTE DOS RATOS E OBTENÇÃO DA AMOSTRA**

Ao final do período experimental para cada grupo (7 ou 14 dias), os ratos foram submetidos a aprofundamento anestésico, através de TBE (tribromoetanol), via jugular. A partir da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, as peças foram removidas através de uma excisão realizada ao redor da ferida com margem de tecido de 1cm, e acondicionadas em frascos plásticos devidamente identificados contendo formol a 10%, com volume aproximadamente igual a cinco vezes o volume da peça, onde permaneceram por 24h para sua fixação. Em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral do Departamento de Propedêutica e Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), onde foram processadas. A gordura retroperitoneal foi removida e, após pesagem, descartada.



**Figura 08** - Gordura retroperitoneal de ratos do Grupo Dieta Padrão (UFBA, 2014).



**Figura 09** - Gordura retroperitoneal de ratos do Grupo Dieta Hiperlipídica (UFBA, 2014).

#### 4.9 – PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO

Utilizando um micrótomo, foram obtidos seis seções de 4  $\mu\text{m}$  de espessura de tecido do dorso de cada animal. Os cortes foram estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano 2% em etanol absoluto) e, posteriormente, armazenados em estufa a 60°C por no mínimo 24 horas para sua melhor fixação. Os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol e hidratados em porcentagens decrescentes de etanol, seguido de incubação em peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS por 40 minutos. Após exposição antigênica através de imersão em solução tampão Citrato 10mH ph 6,0 em steamer a 95°C durante 20 minutos, os cortes foram incubados, conforme padronização, por 10 minutos em Protein Block Serum-Free (K0909, Dako, Carpinteria, CA, USA) para bloqueio de sítios inespecíficos e posterior incubação com o anticorpo primário em câmara úmida a 4°C. A diluição do anticorpo primário, o tempo de incubação e o método de detecção utilizados para cada proteína constam no Quadro 1. A incubação do sistema de detecção ADVANCE HRP (Dako) ocorreu em duas fases por 30 minutos cada. A revelação da reação foi feita com 3,3'-diaminobenzidina (K3468, Dako Liquid DAB Plus, Dako) e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Entre essas pesagens, os cortes foram lavados duas vezes com solução tampão PBS pH 7,4 acrescido de Triton 0,1%.

Os cortes foram desidratados em cadeia de álcool ascendente por 5 minutos cada, nas concentrações (%) de 50, 60, 70, 80, 90, 95, absoluto (1), absoluto (2), absoluto (3) e

diafinizados em dois banhos de xilol. As lâminas foram em seguida montadas em resina Permunt (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) para exame de microscópio de luz.

Os procedimentos de controle envolveram a utilização de amostra com reatividade conhecida positiva para o anticorpo, funcionando como controle externo positivo da reação (Quadro 3). Como controle externo negativo, foi utilizado o mesmo tecido, onde o anticorpo primário foi substituído por soro, devendo a reação ser completamente negativa.

A avaliação imunohistoquímica foi realizada em estudo cego por um patologista experiente, de forma semiquantitativa, de acordo com a proporção de células marcadas e intensidade da imunomarcção do anticorpo, sendo classificados em 0 (0 a 10% de células marcadas), 1 (11 a 50% de células marcadas), 2 (51 a 80% de células marcadas), 3 (81 a 100% de células marcadas) e; 0 (sem imunomarcção), 1 (imunomarcção fraca), 2 (imunomarcção moderada), 3 (imunomarcção forte), respectivamente, ambas avaliadas na derme e hipoderme do tecido (Quadro 4).

Quadro 3: Descrição do anticorpo primário utilizado na reação imunohistoquímica

Anticorpo	Tipo do Anticorpo	Animal Hospedeiro	Marca	Código	Clone	Bloqueio Interações Inespecíficas	Diluição Anticorpo Primário	Kit de Visualização	Tecido Controle Positivo
CD49d	Policlonal	Coelho	Novus Biologicals	NB110-55524	-	Solução bloqueadora	1:400	Advance	Linfonodo



Quadro 4: Critérios utilizados na análise imunohistoquímica (UFBA, 2016).

<b>MARCAÇÃO</b>	<b>INTENSIDADE</b>
<b>0:</b> 0-10%	<b>0:</b> 0
<b>1:</b> 11 - 50%	<b>1:</b> fraco
<b>2:</b> 51 – 80%	<b>2:</b> moderado
<b>3:</b> 81 – 100%	<b>3:</b> forte

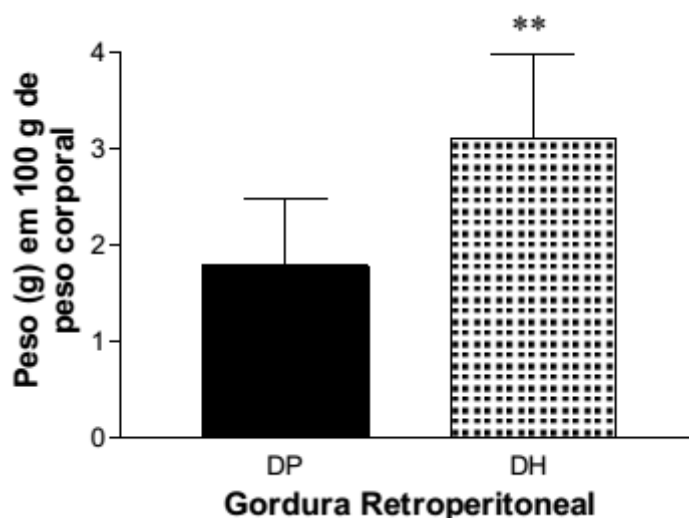
#### **4.10 – ANÁLISE DOS DADOS**

Os dados obtidos foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel e analisados estatisticamente com auxílio do programa minitab versão 17. Foram utilizados os seguintes testes estatísticos: para comparação do peso corporal e gordura retroperitoneal foi utilizado o teste t de Student, considerando uma significância de 5%. Para a comparação intra e intergrupo das variáveis imunohistoquímicas foi utilizado o teste do Qui Quadrado, considerando uma significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 – AVALIAÇÃO DO PESO DA GORDURA RETROPERITONEAL

A dieta hiperlipídica foi capaz de promover o acúmulo de gordura na região retroperitoneal dos ratos do grupo DH. Este grupo apresentou um acúmulo de gordura abdominal significativamente mais elevado quando comparado com o grupo alimentado com dieta padrão ( $p=0,000$ ). A evolução do peso absoluto e relativo da gordura retroperitoneal podem ser observadas na figura 10.



**Figura 10:** Peso relativo da gordura retroperitoneal após 20 semanas de dieta padrão e hiperlipídica. Os resultados estão expressos como  $\pm$  desvio padrão da média. Comparação entre os grupos DP e DH foi estatisticamente significante ( $p=0,000$ ) (teste t de Student).

### 5.2 – ANÁLISE DESCRITIVA

Dos 48 casos analisados, observou-se um padrão da imunomarcagem do anticorpo CD49d distribuído entre citoplasma e/ou núcleo de fibroblastos, mastócitos, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e matriz extracelular, em comum a todos os grupos.

Quando analisadas amostras pertencentes a animais submetidos à dieta hiperlipídica, foi evidenciado, também, imunomarcagem em núcleo e/ou citoplasma de adipócitos.

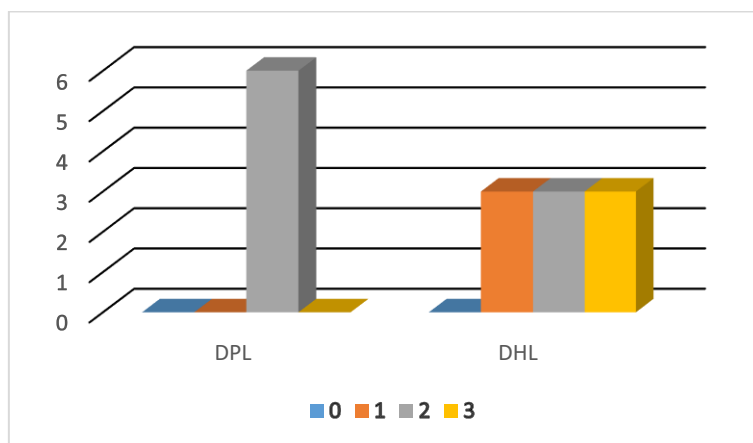
O endotélio de vasos sanguíneos foi considerado o controle interno positivo.

### 5.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### GRUPOS EXPERIMENTAIS DE 7 DIAS

Quando foi analisada a marcação na derme e hipoderme, a análise estatística nos grupos dieta padrão não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos DPC e DPL ( $p>0,05$ ). No grupo dieta hiperlipídica, o grupo irradiado DHL também não diferiu estatisticamente quando comparado com o grupo controle DHC. Quando os grupos dieta padrão (DPC e DPL) foram confrontados com os respectivos grupos dieta hiperlipídica (DHC e DHL), observou-se que também mantiveram graus similares de marcação.

Quando a intensidade da imunomarcção foi avaliada na derme, observou-se tendência estatística para o grupo dieta padrão laser DPL ( $p=0,06$ ) quando comparado com o grupo dieta hiperlipídica laser DHL. Não houve diferença estatisticamente significativa quando a avaliação foi feita entre os grupos não irradiados (Figura 11).



**Figura 11:** Comparação entre os grupos Dieta Padrão Laser e Dieta Hiperlipídica Laser avaliados no período de 7 dias localizado na derme do tecido.  
**Intensidade:**  $p=0,06$ (DPL x DHL) (UFBA, 2016).

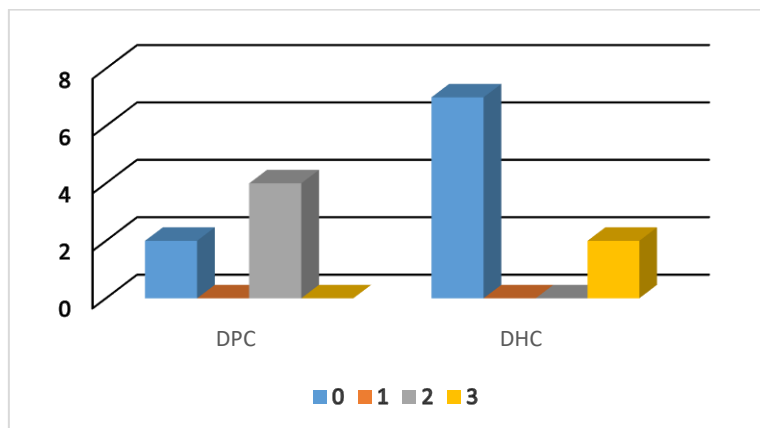
Ao analisar a intensidade na hipoderme, não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica controles e irradiados foram confrontados entre si na avaliação intragrupo ( $p>0,05$ ).

### **GRUPOS EXPERIMENTAIS 14 DIAS**

Quando a análise estatística foi aplicada aos grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica em 14 dias, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando a variável marcação na derme e hipoderme foram aplicadas nas avaliações intra e intergrupos ( $p>0,05$ ).

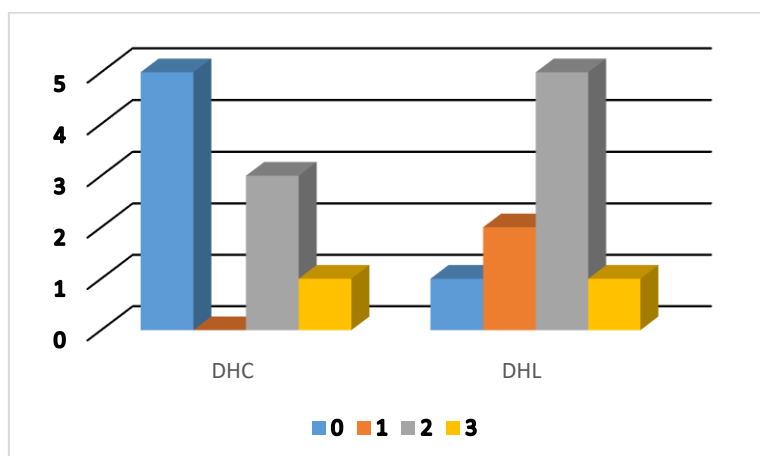
A análise da variável intensidade da imunomarcção localizada na derme revelou que os grupos dieta padrão controle DPC e dieta hiperlipídica controle DHC diferiram estatisticamente ( $p= 0,025$ ). O grupo DPC apresentou maior identificação de anticorpos

marcados com sinalização moderada a intensa que o grupo DHC, o qual prevaleceu a coloração fraca (Figura 12).

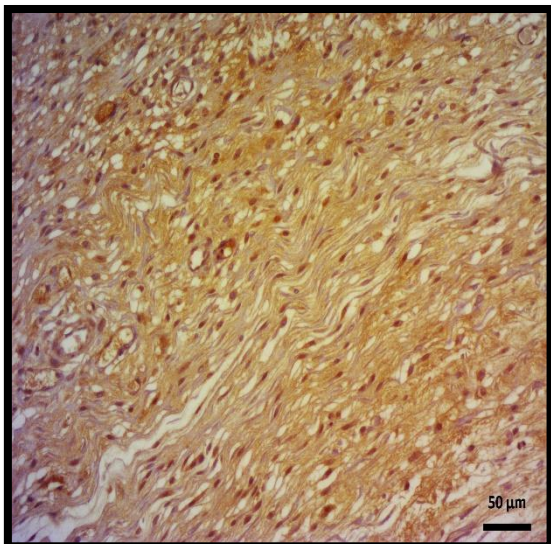


**Figura12:** Comparação entre os grupos Dieta Padrão Controle e Dieta Hiperlipídica Controle avaliados no período de 14 dias localizado na derme do tecido.  
**Intensidade:**  $p=0,025$ (DPC x DHC) (UFBA, 2016).

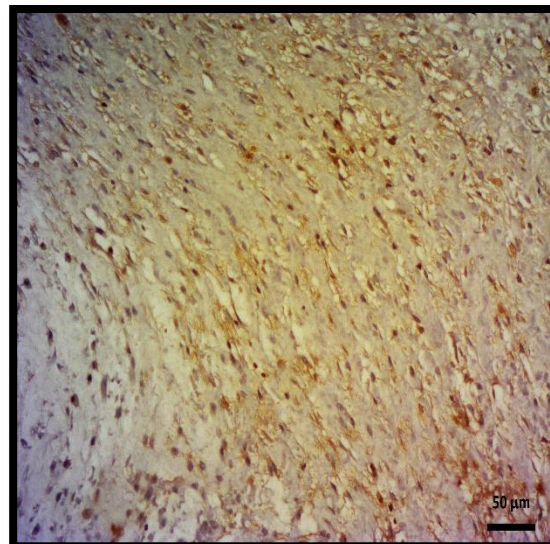
Em relação à intensidade da imunomarcagem na hipoderme, foi identificada uma tendência estatística ( $p=0,06$ ) quando comparados os grupos dieta hiperlipídica controle DHC e dieta hiperlipídica laser DHL. O grupo DHL apresentou mais colorações do anticorpo de moderada a intensa, enquanto o grupo DHC teve em sua maioria coloração fraca (Figura 13).



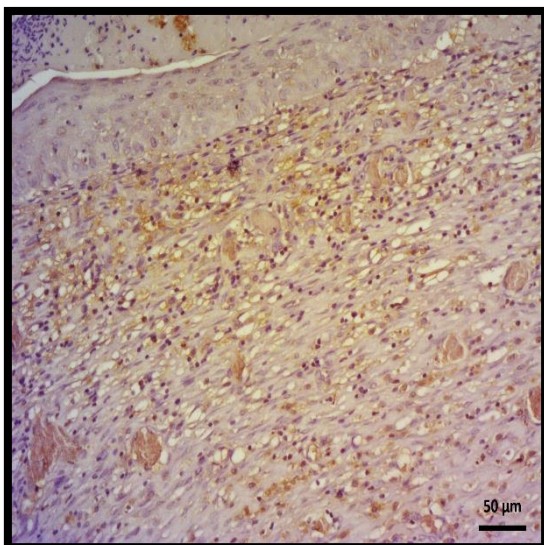
**Figura 13:** Comparação entre os grupos Dieta Hiperlipídica Controle e Dieta Hiperlipídica Laser avaliados no período de 14 dias localizado na hipoderme do tecido.  
**Intensidade:**  $p=0,06$ (DHC x DHL) (UFBA, 2016).



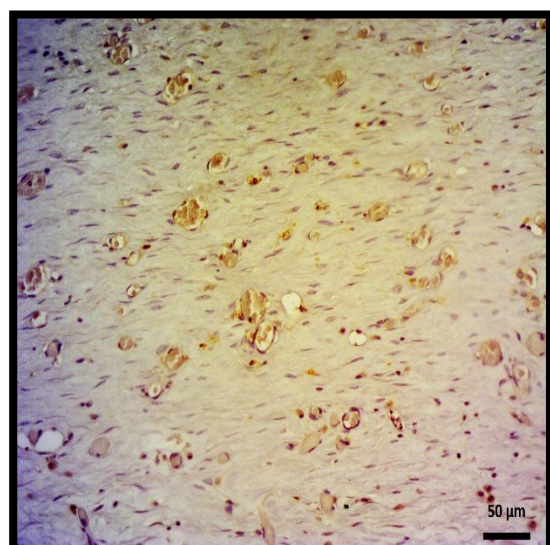
**Figura 14** – Fotomicrografia do grupo Dieta Padrão Laser aos 7 dias mostrando intensidade da imunomarcção moderada na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).



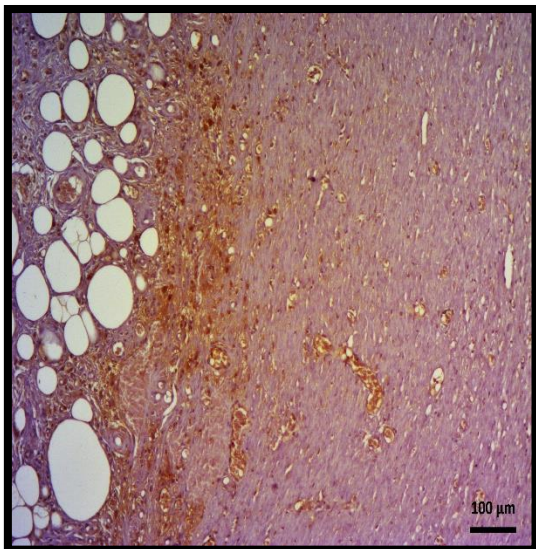
**Figura 15** - Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Laser aos 7 dias mostrando intensidade da imunomarcção fraca na derme (aumento aproximado de 10X) (UFBA, 2016).



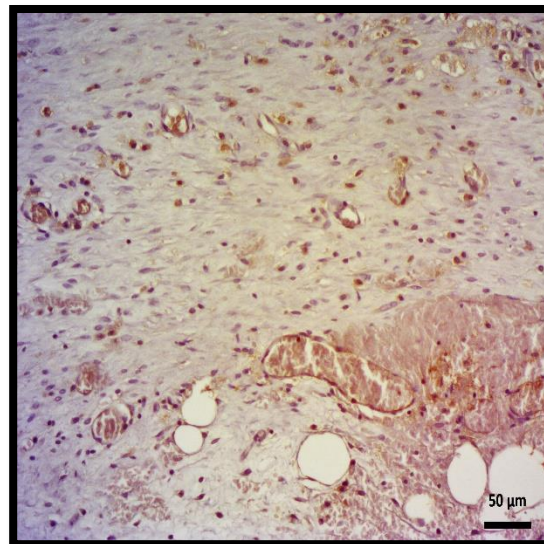
**Figura 16** - Fotomicrografia do grupo Dieta Padrão Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcção moderada na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).



**Figura 17** - Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarcção fraca na derme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).



**Figura 18** - Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Laser aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarketing intensa na hipoderme (aumento aproximado de 10X) (UFBA, 2016).



**Figura 19** - Fotomicrografia do grupo Dieta Hiperlipídica Controle aos 14 dias mostrando intensidade da imunomarketing fraca na hipoderme (aumento aproximado de 20X) (UFBA, 2016).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o consumo de uma dieta com maior teor lipídico e os efeitos desta dieta e da fototerapia a laser no reparo tecidual de feridas subcutâneas em ratos da raça Wistar. O acúmulo de tecido adiposo retarda o processo de reparo por prolongar a fase inflamatória da cicatrização (BIONDO-SIMOES et al., 2010; JERONIMO, 2010; SLAVKOVSKY et al., 2011; CIGNARELLI et al., 2012).

O aumento da ingestão de calorias induz à obtenção de peso e consequente risco para a o desenvolvimento da obesidade, aumentando, também, o número de problemas relacionados a esta doença. A obesidade é um obstáculo no processo do reparo das feridas, os estudos realizados em animais comprovam esta afirmativa, sendo a cicatrização deficiente quando comparados animais acima do peso com os animais normais (BIONDO-SIMÕES et al., 2010; JERONIMO, 2010; SLAVKOVSKY et al., 2011).

Um modelo utilizado por Slavskovsky e cols. (2011), com ratos Zucker diabetic Fatty (ZDF), geneticamente modificados, foram utilizados para avaliar o reparo tecidual das feridas. Os ratos obesos e diabéticos apresentaram um retardo no processo de cicatrização, com prolongamento no processo inflamatório e demora na redução da ferida quando comparado com os ratos normais. Os autores sugeriram que o tecido adiposo pode influenciar na cicatrização de feridas por diversos fatores, como a limitação da migração celular e o aumento na produção de adipocinas. Pode prejudicar a organização de fibroblastos e miofibroblastos e, além disso, o retardo na contração pode ser mediado através de alterações físicas tais como tensão na pele devido à obesidade.

É sabido que uma dieta hiperlipídica pode promover obesidade em ratos; no entanto, nas avaliações com modelos animais, alguns mostram-se resistentes à indução a obesidade, como observado nesse estudo, corroborando com trabalhos anteriores (RAVAGNANI et al., 2012; ROSINI et al., 2012), o que demonstra que, semelhante aos humanos, os ratos também apresentam uma distribuição bimodal de massa corporal, e portanto, nem todos os ratos alimentados com uma dieta rica em gordura tornam-se obesos.

A dieta hipercalórica utilizada para promover obesidade em modelos experimentais pode ser apresentada sob diversas formas de pastilha ou como alimentos processados, esta segunda sendo mais conhecida como dieta de cafeteria, ocidentalizada ou de fast-food, uma combinação altamente energética e mais próxima dos alimentos consumidos pelos seres humanos (ESTADELLA et al., 2011; GOBO, 2014). A dieta de cafeteria foi

usada nesse experimento, e de fato, a sua ingestão promoveu aumento de tecido adiposo e ganho de peso corporal na maioria dos animais que a consumiram.

White e cols. (2013) afirmaram em seu estudo que os modelos animais submetidos à dieta mais calórica ingeriram menos ração, em gramas, que o grupo com dieta padrão. No entanto, como a densidade energética da ração hiperlipídica é maior, a obesidade pôde ser constatada. Nesse estudo a obesidade foi comprovada pelo maior acúmulo de gordura na região retroperitoneal e abdominal dos ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

Andrade e cols. (1998) apresentaram a evidência da possibilidade de que os adipócitos se transformem em fibroblastos. Sua hipótese foi baseada na sequência de tempo do estudo, no qual observou-se inicialmente células de gordura grandes com múltiplas gotículas e, mais tarde, o aparecimento de células progressivamente alongadas, onde as gotículas de gordura tenderam a diminuir em tamanho e número. Essa teoria pode ser explicada pelo potencial de células multipotentes no tecido adiposo (ÁLVAREZ-VIEJO et al., 2015; HIGUCHI et al., 2015; HUTTALA et al., 2015).

Abrahamse demonstrou em seu estudo de 2012 que a irradiação laser de baixa potência induz a atividade de células-tronco derivadas do tecido adiposo aumentando a migração, proliferação e viabilidade, ativando a expressão da proteína e na indução da diferenciação de células progenitoras. Kushibiki e cols. (2015) corroboraram com esses achados ao concluírem em seu trabalho que a laserterapia é uma alternativa promissora para novas aplicabilidades com células-tronco.

Vários fatores são considerados importantes para os resultados dos tratamentos da laserterapia e a utilização de muitos dos protocolos geram resultados conflitantes. Sendo assim, a escolha dos parâmetros é essencial para conseguir bons resultados. Estes parâmetros incluem: comprimento de onda, a densidade de potência, dose, duração, frequência de aplicações, dentre outros (PINHEIRO et al., 2010). Autores acreditam que ajustando a dose e o tempo de aplicação do laser, alcançando parâmetros ideais, poderiam obter melhores resultados e a partir de novos estudos em modelos animais poderão contribuir para o desenvolvimento de terapia celular. Os parâmetros utilizados nesse estudo não foram capazes de produzir resultados significativos nos grupos irradiados.

Alguns autores (CHEN et al., 2005; HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006) relataram na literatura resultados em que a luz laser não obteve efeito ou inibiu o reparo tecidual. Estes resultados tendem a ocorrer devido ao uso diversificado de modelos experimentais, tipos de lasers, comprimento de onda, potência, tempo, frequência e número de irradiações. Nos parâmetros utilizados nesse estudo, a luz laser não obteve



efeito significativo sobre a molécula CD49 durante o reparo da ferida, tanto de ratos obesos quanto em peso normal.

O estudo de Hawkins & Abrahamse (2006) mostrou que exposições com doses mais elevadas podem causar tensão à célula, reduzindo a viabilidade celular, atividade do ATP e a inibição da proliferação celular. Os autores avaliaram a resposta celular à exposição de 3 doses diferentes de irradiação (2,5, 5, e 16 J/cm<sup>2</sup>). Os resultados mostraram que uma única dose de 5,0 J/cm<sup>2</sup>, e duas ou três doses de 2,5 J/cm<sup>2</sup> tiveram um efeito estimulador sobre os fibroblastos, entretanto, múltiplas exposições a doses mais elevadas (16 J/cm<sup>2</sup>) causaram tensão adicional às células, o que reduziu a migração celular, atividade de ATP e inibiu a proliferação celular. Sendo assim, a densidade de energia e número de exposições combinados são necessários para que a atividade mitocondrial seja estimulada sem que ocorram danos adicionais às células e a fototerapia a laser obtenha sucesso.

Nossos achados demonstram que a intensidade da imunexpressão do CD49 no grupo DHL diferiu nos períodos de 7 e 14 dias, passando de fraca a moderada, respectivamente, indicando que aumento do número de células envolvidas no processo de reparo no tecido dos animais obesos. Esse resultado corrobora com a teoria do efeito biomodulador do laser cumulativo ao longo do tempo.

A escolha do comprimento de onda utilizado no presente estudo baseou-se no fato de que 660 nm possui uma absorção superficial (PINHEIRO et al., 2010), sendo indicada para as lesões que acometem feridas excisionais mais superficiais, já que os efeitos dos lasers nas células são dependentes do comprimento de onda e doses utilizadas.

Em relação ao protocolo utilizado, nós concordamos com a maioria dos autores que sugerem que um intervalo de 48h entre as aplicações do laser seja o mais indicado (VIEGAS et al, 2007; AL-WATBAN et al., 2009; RAMALHO et al., 2010), contudo, existem trabalhos que sugerem a aplicação com intervalos de 24h (PINHEIRO, 2009; USUMEZ et al., 2014) e, conseguiram os mesmos efeitos satisfatórios quando comparados aos trabalhos realizados com aplicações intercaladas.

A luz laser estimula as células com déficit funcional a proliferarem no momento que estão sendo irradiadas. Portanto, um tecido completamente funcional com suas células crescendo de maneira ordenada e normal, o potencial celular é suficiente e não existe nenhum estímulo para que a ação do laser seja iniciada, por isso o efeito sobre o tecido será fraco, ou nenhum efeito terapêutico será observado. Contudo, se o tecido está alterado, a luz laser agirá com maior efeito sobre ele tentando restabelecer a função celular. Diante disto, há que se destacar que, um dos fatores para a fotosensibilidade

celular depende do estado em que ela se encontra no momento da irradiação (PINHEIRO et al., 2010; GRECCO, 2013). Isso pode explicar porque os efeitos fotobiomoduladores nem sempre podem ser detectados.

Uma variedade de estudos encontrados na literatura demonstra o efeito da luz laser na proliferação e diferenciação de células-tronco. A revisão sistemática realizada por Ginani e cols. (2014) em artigos publicados nos últimos 14 anos revelou que a terapia a laser aumenta significativamente o número inicial de células-tronco antes de diferenciação, aumentando assim, o número de células diferenciadas para a engenharia de tecidos e de regeneração. Por outro lado, os dados disponíveis na literatura sobre os parâmetros usados são ainda limitados e, às vezes conflitantes, principalmente por falta de padronização, com o comprimento de onda, densidade de potência, radiação, tempo, e o estado de polarização da luz, os quais podem influenciar na obtenção dos efeitos biológicos.

Já a revisão realizada por Fekrazad<sup>b</sup> e cols. (2016) levantou a hipótese que o efeito positivo da fotobioestimulação na proliferação das células-tronco mesenquimais em alguns estudos sugerem que lasers sozinhos não causam diferenciação celular significativa.t

Baseando-se na possibilidade da molécula CD49 ser responsável pela adesão leucocitária ao endotélio durante um processo inflamatório (CRUSE et al., 2002; BRADAWY et al., 2013), esse estudo levanta a hipótese que moléculas de CD49 expressas na derme com intensidade fraca no grupo de dieta hiperlipídica irradiado por 7 dias e, com intensidade moderada na hipoderme do grupo hiperlipídico irradiado por 14 dias, pode ser resultado do aumento da proliferação de células envolvidas no reparo tecidual, como os leucócitos, fibroblastos ou células-tronco.

Visto que a engenharia tecidual com células-tronco é um processo complexo e que envolve uma série articulada de eventos biológicos, qualquer interferência neste processo leva a resultados diversos e, por vezes, contraditórios. Por conta disso, as pesquisas com o uso da fototerapia a laser devem ser estimuladas, para que seus parâmetros sejam, cada vez mais, padronizados e os seus benefícios se ampliem aos mais variados problemas de saúde que possam interferir no meticuloso processo da terapia celular.

## **7. CONCLUSÃO**

A fototerapia a laser, nos parâmetros empregados, não foi capaz de influenciar o marcador CD49 na cicatrização da ferida induzida, e assim, assumir que células-tronco derivadas do tecido adiposo teriam tido alguma influência da luz. No entanto, nesse estudo, a tendência estatística entre grupos de ratos obesos irradiados em 7 e 14 dias, levanta a suspeita da participação da luz laser em excitar células envolvidas no reparo tecidual.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAMSE, H et al. Regenerative medicine, stem cells, and lowlevel laser therapy: future directives. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.30, n.12, p.681–682, 2012.
2. ABREU FREITAS, R.P.A. et al. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas?. **Fisioter Pesq.** v.20, n.1, p.24-30, 2013.
3. Álvarez-Viejo, M.; Menéndez-Menéndez, Y.; Otero-Hernández, J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. **World J Stem Cells.** v.7, n.2, p.470-476, 2015.
4. ALVES, A.C.O. Identificação de micrnas associados aos polissomos durante a diferenciação adipogênica das células-tronco derivadas do tecido adiposo. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas. 2014
5. AL-WATBAN, F.A.H. Laser Therapy Converts Diabetic Wound Healing to Normal Healing. **Photomedicine and Laser Surgery.** v.27, n.1, p.127-135, 2009.
6. ANDRADE, F.S.S.D.; CLARK, R.M.O.; FERREIRA, M.L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Rev. Col. Bras. Cir.** v.41, n.2, p.129-133, 2014.
7. ANDRADE, Z.A.; DE-OLIVEIRA-FILHO, J.; FERNANDES, A.L.M. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an ultrastructural study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.31, p.659-664, 1998.
8. BACH, M. et al. Influence of murine mesenchymal stem cells on proliferation, phenotype, vitality, and cytotoxicity of murine cytokine-induced killer cells in coculture. **Plos One.** published online Fev. 2014.
9. BADRAWY, N.E. et al. Expression of CD29 and CD49 in HCV-patients with chronic hepatitis, cirrhosis and hepato cellular carcinoma. **Life Science Journal.** published online 2013.
10. BARBOSA, K.G.N. et al. Analgesia durante o tratamento ortodôntico com o uso do laser de baixa intensidade: revisão sistemática. **Rev Dor.** v.14, n.2, 2013.
11. BARBOZA, C.A.G. et al. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein.** v.12, n.1, p.75-81, 2014.
12. BASSI, G. et al. Adipose-derived stromal cells (ASCs). **Transfusion and Apheresis Science.** v.47, p.193–198, 2012.
13. BASSO, F.G. et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level Laser therapy. **Photochemistry and Photobiology.** v.91, p.952-956, 2015.
14. BERTASO, A.G. et al. Gordura epicárdica: definição, medidas e revisão sistemática dos principais desfechos. **Arq Bras Cardiol.** v.101, n.1, 2013.
15. BIONDO-SIMÕES, M.L.P. et al. Obesity and abdominal wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.24, n.1, p.86-92, 2010.
16. BLATT, A. et al. Low-level laser therapy to the bone marrow reduces scarring and improves heart function post-acute myocardial infarction in the pig. **Photomedicine and Laser Surgery.** v.0, p.1–9, 2016.
17. BOURGUIGNON-FILHO, A.M. et al. Utilização do Laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão da literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial.** v. 46, n. 1, 2005.

18. BUSSER, H. et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: comparison of bone marrow and adipose tissue. **Stem Cells and Development**. v.24, n.18, 2015.
19. CAVALCANTI, M.F.X.B. et al. Evaluation of the proliferative effects induced by low-level laser therapy in bone marrow stem cell culture. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.33, n.12, 2015.
20. CAVALCANTI, T.M. et al. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. **An Bras Dermatol**. v.86, n.5, p.955-60, 2011.
21. CHAGAS JÚNIOR, O.L.; VETROMILLA, B.M.; BARBALHO, J.C.M.; PAGNONCELLI, R.M.; SONEGO, C.L. Laser terapêutico e células inflamatórias – parte 2: neutrófilos. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe* v.13, n.3, p. 111-118, abr./jun. 2013.
22. CHEN, Y. et al. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**. v.25, n.1, p.83–89, 2005.
23. CIGNARELLI, A. et al. Human adipose tissue stem cells: relevance in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases and therapeutic applications. **Expert Rev. Mol. Med**. v. 14, n.19, 2012.
24. CRAVERO, D. et al. Bovine CD49 positive-cell subpopulation remarkably increases in mammary epithelial cells that retain a stem-like phenotype. **Research in Veterinary Science**. v.102, p.1–6, 2015.
25. CRUSE, J.M. et al. Cellular and molecular alterations in spinal cord injury patients with pressure ulcers: a preliminary report. **Experimental and Molecular Pathology**. v.72, p.124–131, 2002.
26. CHUNG, H. et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals Biomedical Engineering**. v.40, n.2, p.516-533, February, 2012.
27. DE CASTRO, J.F.L. et al. Low-level Laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Photomedicine and Laser surgery**, v. 31, n. 12, 2013.
28. ESTADELLA, D et al. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Nutrition**. v.20, n.2, p.218–224, 2004.
29. FEKRAZAD<sup>a</sup>, R. et al. Effects of photobiomodulation and mesenchymal stem cells on articular cartilage defects in a rabbit model. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.X, n.X, 2016.
30. FEKRAZAD<sup>b</sup>, R. et al. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.X, n.X, 2016.
31. FIGUEIREDO, A.L.P. et al. Laser terapia no controle da mucosite oral: um estudo de metanálise. **Rev. assoc med bras**. v.59, n.5, p.467-474, 2013.
32. FREITAS, A.C.C. et al. Chemotherapy-induced oral mucositis: effect of LED and Laser phototherapy treatment protocols. **Photomedicine and Laser surgery**, v. 32, n. 2, 2014.
33. FU, X. et al. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation. **Molecular Medicine Reports**. v.14, p.1187-1193, 2016.
34. GAIBA, S. Angiotensina II em células-tronco do tecido adiposo humano. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo. 2012
35. GAIBA, S.; FRANÇA, L.P.; FRANÇA, J.P.; FERREIRA, L.M. Caracterização de células-tronco do tecido adiposo humano. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.27, n.7, 2012.

36. GEORGES, J.A.O. Derivação de novas linhagens brasileiras de células-tronco embrionárias humanas sob condições fisiológicas de oxigênio. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2014.
37. GHARAKHANLOU, R. et al. Medidas Antropométricas como Preditoras de Fatores de Risco Cardiovascular na População Urbana do Irã. **Arq Bras Cardiol.** v.98, n.2, p.126-135, 2012.
38. GINANI, F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci.** v.30, p.2189–2194, 2015.
39. GUO, S.; DIPIETRO, S.S. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research.** v. 89, n.3, p.219-229, 2010.
40. GRECCO, C. Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimento de onda. Tese apresentada ao programa de pós graduação em Física da Universidade de São Paulo. 2013.
41. Hawkins, D.; Abrahamse, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.** v.24, p.705–714, 2006.
42. HENDUDARI, F. et al. Combined effects of low-level laser therapy and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on viability of human dermal fibroblasts cultured in a high-glucose médium. **Lasers Med Sci.** v.31, p.749–757, 2016.
43. HENRIQUES, A.C.G.; MAIA, A.M.A.; CIMÕES, R.; de CASTRO, J.F.L. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. **Odontologia. Clín.-Científ.** v.3, p.197-200, 2008.
44. HIGUCHI, A. et al. A hybrid-membrane migration method to isolate high-purity adipose-derived stem cells from fat tissues. **Scientific Reports.** v.5, 2015.
45. HUTTALA, O. et al. Differentiation of human adipose stromal cells in vitro into insulin-sensitive adipocytes. **Cell Tissue Res** DOI 10.1007/s00441-016-2409-7
46. INÁCIO, J.C. Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Médica da Universidade Estadual Paulista. 2011
47. JENKINS, P.A.; CARROLL, J.D. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/ Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. **Photomedicine and Laser Surgery.** v.29, n.12, p.785-787, 2011.
48. KAMIMURA, M.A. et al. Variações nos níveis de adiponectina nos pacientes com doença renal crônica: um estudo prospectivo de 12 meses. **J Bras Nefrol.** v.34, n.3, p.259-265, 2012.
49. KERSHAW, E.E.; FLIER, J.J. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. The **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v.89, n.6, p.2548-2556, 2004.
50. KIM, J.H. et al. Early intervention with highly condensed adipose-derived stem cells for complicated wounds following filler injections. **Aesth Plast Surg** DOI 10.1007/s00266-016-0636-7
51. KIM, W.-S. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science.** v.48, p.15—24, 2007
52. KUSHIBIKI, T. et al. Low Reactive Level Laser Therapy for Mesenchymal Stromal Cells Therapies. **Stem Cells International.**2015

53. LEE, M.J.; WU, Y.; FRIED, S.K. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v.13, n.4, p.371-376, 2010.
54. LINS, R.D.A.U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**. v.85, n.6, 2010.
55. MAGALHÃES, E. et al. Uso de preditores clínicos simples no diagnóstico pré-operatório de dificuldade de intubação endotraqueal em pacientes portadores de obesidade. **Rev Bras Anesthesiol**. v.63, n.3, p.262-266, 2013.
56. MATTIELLO, F.D.L. et al. In vitro effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus sanguinis*. **Braz Dent J**. v.22, n.5, 2011.
57. MEDINA-GOMEZ, G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.26, p.791-804, 2012.
58. MEZZARANE, L.A. Proposta de protocolo clínico para utilização do laser de baixa potência em Estomatite Protética Associada à Candidose Atrófica. Proposta de protocolo clínico para utilização do laser de baixa potência em estomatite protética associada à candidose atrófica. Dissertação apresentada ao programa de pós graduação na área de Lasers em Odontologia da Universidade de São Paulo. 2007.
59. MIN, K.H. et al. Effect of low-level laser therapy on human adipose-derived stem cells: in vitro and in vivo studies. **Aesth Plast Surg**. v.39, p.778-782, 2015.
60. MITTERBERGER, M.C. et al. DLK1(PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in CD105 +/CD90 +/CD34 +/CD31 -/FABP4 - adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pats of adult women. **Stem Cell Research**. v.9, p.35-48, 2012.
61. MIYATA, Y. et al. Identification of Mouse Mesenteric and Subcutaneous in vitro Adipogenic Cells. **Scientific Reports**. v.6, 2016.
62. MOREIRA, F.F. et al. Laserterapia de baixa intensidade na expressão de colágeno após lesão muscular cirúrgica. **Fisioterapia e Pesquisa**. v.18, n.1, p. 37-42, 2011.
63. NGUYEN, V.A. et al. Adhesion of dendritic cells derived from CD34+ progenitors to resting human dermal microvascular endothelial cells is down-regulated upon maturation and partially depends on CD11a-CD18, CD11b-CD18 and CD36. **Eur. J. Immunol**. v.32, p.3638-3650, 2002.
64. O'CEARBHAILL, E. et al. Behavior of human mesenchymal stem cells in fibrin-based vascular tissue engineering constructs. **Annals of Biomedical Engineering**. v.38, n.3, p.649-657, 2010.
65. OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.6, n.4, p.267-271, 2012.
66. OLIVEIRA, P. et al. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ultrassom de baixa intensidade no processo de reparo ósseo em tibia de rato. **Rev Bras Fisioter**. v. 15, n. 3, 2011.
67. OLIVEIRA, T.W.S. A perinatal Palatable High-fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. **Lipids**. v.46, p.1071-1074, 2011.
68. OTON-LEITE, A.F. et al. Effect of low-level Laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.47, p.296-305, 2015.
69. PARAGUASSU, G.M. et al. Effects of LED phototherapy on relative wound contraction and reepithelialization during tissue repair in hypothyroid rats:

- morphometric and histological study. **Lasers Medical in Science**. published online Aug. 2013.
70. PARK, I-S.; CHUNG, P-S.; AHN, J.C. Enhancement of ischemic wound healing by spheroid grafting of human adipose-derived stem cells treated with low-level light irradiation. **PLoS ONE**. v.10, n.6, 2015.
  71. PAVENLOSKI-COSTA, A.C. et al. Treinamento resistido reduz inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.55, n.2, 2011.
  72. PIERINI, E.; ASSUNÇÃO, F.F.O. **MTP & Rehab Journal**. v.12, p.218-233, 2014.
  73. PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. Aplicação do Laser na Odontologia. São Paulo: Santos Editora Ltda., 2010.
  74. PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulative Effects of Visible and IR Laser Light on the Healing of Cutaneous Wounds of Nourished and Undernourished Wistar Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.27, n.6, p.947-957, 2009.
  75. PIVA, J.A.A.C. et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **An Bras Dermatol**. v.86, n.5, 2011.
  76. RAVAGNANI, F.C.P. et al. Efeito de dietas hiperlipídicas com extrato de bauru e chocolate sobre a área de adipócitos de ratos submetidos ao exercício físico. **Rev Bras Med Esporte**. v.18, n.3, 2012.
  77. ROCHA, C.L.J.V. et al. Inibição da expressão de ciclooxygenase 2 em feridas cutâneas de camundongos NOD submetidos à terapia a laser de baixa intensidade. **J Vasc Bras**. v.11, n.3, p.175-181, 2012.
  78. ROCHA, R. Fronteiras terapêuticas em expansão: engenharia de tecidos e células-tronco. **Dental Press J Orthod**. v.16, n.5, p.9-17, 2011.
  79. ROSINI, T.C.; SILVA, A.S.R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev Assoc Med Bras**. v.58, n.3, p.383-387, 2012.
  80. RUH, A.C.; FERNANDES, D.; ARTONI, R.F.; FAVERO, G.M. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, v.19, n.1, p. 11-19, jan./jun. 2013.
  81. SAGAE, S.C. et al. Bloqueio do receptor AT1 da Angiotensina II reduz o número de folículos antrais em ratas com obesidade induzida por dieta de cafeteria. **Rev Bras Ginecol**. v.37, n.7, 2015.
  82. SALDANHA, L.A. Efeitos da ingestão de cafeína, café (*Coffea arabica*) e chá mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a atividade lipolítica do tecido adiposo e parâmetros metabólicos em ratos submetidos ao exercício físico. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Nutrição em Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2012.
  83. SANTUZZI, C.H.; BUSS, H.F.; PEDROSA, D.F.; FREIRE, M.O.V.M.; NOGUEIRA, B.V.; GONÇALVES, W.L.S. **An Bras Dermatol**. 2011;86(2):278-83.
  84. SARTORI-CINTRA, A.R.; AIKAWA, P.; CINTRA, D.E.C. Obesity versus osteoarthritis: beyond the mechanical overload. **Enstein**. v.12, n.3, 2014.
  85. SCHWEINBERGER, M.H; ROUKIS, T.S. Wound Complications. **Clinical Podiatric Medical Surgery**. v.26, p.1-10, 2009.
  86. SILVA, G.B.L. et al. Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. **Lasers Med Sci**. v.30, p.117-126, 2015.



87. SLAVKOVSKY, R. et al. Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. **Wound Repair and Regeneration**. v.19, p.515-525, 2011.
88. SOUZA, L.B.L. et al. Influência do Laser ER:YAG na adesividade intrarradicular – teste mecânico e microscopia eletrônica d varredura. **Rev fluminense de odontologia**. n. 36, 2011.
89. SPENER, R.F. et al. Expressão gênica de adiponectina no tecido adiposo epicárdico após intervenção coronária percutânea com implante de stent metálico. **Rev Bras Cir Cardiovasc**. v.26, n.3, 2011.
90. SULLIVAN, M.O. et al. Comparison of mesenchymal stem cell surface markers from bone marrow aspirates and adipose stromal vascular fraction sites. **Frontiers in Veterinary Science**. v.82, n.2, 2016.
91. TAMBOGA, I. et al. The effect of low level laser therapy on pain during dental tooth-cavity preparation in children. **European Archives of Paediatric Dentistry**. v.12, n.2, p.93-95, 2011.
92. TISSIANI, L.A.L. et al. Efeitos de diferentes pressões de aspiração do tecido adiposo na obtenção de células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Cir Plást**. v.27, n.4, 2012.
93. TRUMBULL, A.; SUBRAMANIAN, G.; YILDIRIM-AYAN, E. Mechanoresponsive musculoskeletal tissue differentiation of adipose-derived stem cells. **BioMed Eng OnLine**. v.43, n.15, 2016.
94. USUMEZ, AL., et al. Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. **Lasers Med Sci**. v.29, p.1807-1813.
95. UZEDA E SILVA, V.D., et al. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. **Lasers Med Sci**. published online. 2016.
96. VIEGAS, N.V. et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Inflammatory reactions during Wound Healing: Comparison with Meloxicam. **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n.6, p. 467-473, 2007.
97. WHITE, P.A.S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.57, n.5, 2013.
98. WOOD, I.S. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.68, p.370-377, 2009.
99. YE, J. et al. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin eduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**. v. 293, p.E1118–E1128, 2007.
100. YOUSSEF, D.M. et al. Influência da leptina no equilíbrio Th1/Th2 em crianças asmáticas obesas. **J Bras Pneumol**. v.39, n.5, p.562-568, 2013.
101. ZACCARA, I.M. et al. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers Med Sci**. v.30, p.2259–2264, 2015.
102. ZIMMERMANN, A. Células-tronco mesequimais derivadas do tecido adiposo autólogo associadas a hidroxapatita na regeneração óssea guiada da calvária de coelhos. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade de São Paulo. 2015.

103. ZUTTON, M.S.S.R. et al. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica. Rev Bras Cardiol Invasiva. v.21, n.3, 2013.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**


**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Antônio Pinho, 62 - Candeia  
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 3283-8966  
Home-page: www.ufba.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa nº.02.12 "IMUNOEXPRESSIONÃO DE MARCADORES DA FOTBIOMODULAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA" de autoria de LUCIANA MARIA PEDREIRA RAMALHO, foi analisado pela Comissão de Ética no Uso de Animais e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 20 de dezembro de 2012

  
**Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro**  
**Presidente da CEUA**

Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro-PhD  
Presidente-CEUA  
Mat. 1749808