

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

POTENCIAL TERATOGENICO DA LASERTERAPIA DE BAIXA  
POTÊNCIA: *Rattus norvegicus* COMO MODELO

Bolsista: Mariah Normando Pereira, CNPq

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-B/0065/2013

POTENCIAL TERATOGENICO DA LASERTERAPIA DE BAIXA  
POTÊNCIA: *Rattus norvegicus* COMO MODELO

Bolsista: Mariah Normando Pereira, CNPq  
Orientadora: Maria Claudia Gross

MANAUS  
2014

## RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial genotóxico da radiação da Laserterapia de Baixa Potência (LLLT) na prole de ratas (*Rattus norvegicus albinus*), esclarecendo a utilização desta como tratamento em útero grávidico. A LLLT tem sido usada em tratamentos de regeneração tecidual em diversos tecidos. Os efeitos adversos dessa forma de terapia não compreendidos e diferentes componentes, como por exemplo, a potência do laser e o processo de diferenciação celular nos tecidos, podem interferir nos resultados da mesma. Este fato pode explicar a contraindicação preventiva do tratamento em gestantes, uma vez que não há estudos precisos sobre o risco do método para o feto. Para este trabalho induziram-se lesões nos tecidos de ratas grávidas. Após, estas foram submetidas a LLLT sob diferentes métodos e intensidades de radiação, e divididas de forma aleatória em 6 grupos: Arsenieto de Gálio (ArGa) 6 J/cm<sup>2</sup>; ArGa 10 J/cm<sup>2</sup>; Arsenieto de Gálio e Alumínio (ArGaAl) 4 J/cm<sup>2</sup>; ArGaAl 6 J/cm<sup>2</sup>; AsGaAl 10 J/cm<sup>2</sup>; grupo controle (não irradiado). Os fêmures de cada um dos vinte e nove indivíduos da prole foram retirados para a obtenção da medula óssea, a fim de que lâminas com cromossomos mitóticos corados com Giemsa fossem observados. Foram analisadas trinta metáfases cada indivíduo, visando determinar o número diploide da amostra (2n=42 cromossomos) e possíveis alterações nos cromossomos ocasionadas pela radiação. Ao final, utilizou-se do método de análise de dados estatísticos Mann-Whitney para verificar a existência de diferenças entre os grupos. Dentre o número de células alteradas encontradas e quantificadas (1,84%), destacaram-se as do tipo quebra (75%) e falha/gap (25%). As relações de danos causados entre: os 6 grupos (p = 0,858), os diferentes tipos de métodos (p = 0,607), os grupos irradiados com Arsenieto de Gálio 6 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> (p = 0,576) e os irradiados com Arsenieto de Gálio e Alumínio 4 J/cm<sup>2</sup>, 6 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> (p = 0,77), demonstraram ausência de diferença estatística. Logo, apesar das alterações cromossômicas encontradas na prole, não houve significância estatística que comprovasse a indução de defeitos nos cromossomos pela radiação. Palavras-Chaves: Laserterapia; Ratas Grávidas; Alterações Cromossômicas; Potencial Genotóxico.

## ABSTRACT

The present study aims to evaluate the genotoxic potential of radiation from low level laser therapy (LLLT) in the offspring of rats (*Rattus norvegicus*), explaining how the use of this treatment in pregnant uterus. LLLT has been used in tissue regeneration treatments in various tissues. The adverse effect of this form of therapy is understood and various components, such as the laser power and the process of cell differentiation in tissue can influence the results thereof. This may explain the preventive treatment contraindication in pregnant women, since there is no accurate method on the risk to the fetus studies. For this work were induced tissue damage in pregnant rats. After they underwent LLLT under different methods and intensities of radiation, and randomly divided into 6 groups: Gallium Arsenide (AsGa) 6 J/cm<sup>2</sup>; AsGa 10 J/cm<sup>2</sup>; Gallium Arsenide and Aluminium (AsGaAl) 4 J/cm<sup>2</sup>; AsGaAl 6 J/cm<sup>2</sup>; AsGaAl 10 J/cm<sup>2</sup>; control (non-irradiated) group. The femurs of each of the twenty-nine individuals of the offspring were removed to obtain the bone marrow, so that blades with mitotic chromosomes stained with Giemsa were observed. These thirty metaphases each, accounted to determine the diploid number of the sample (2n= 42 chromosomes) and possible changes in chromosomes caused by radiation were analyzed. At the end, we used a method of statistical data analysis Mann-Whitney to verify the existence of differences between groups. Among the number of altered cells found and quantified (1.84%), it is noticeable the type breaks (75%) and failure/*gap* (25%). The relationship between damage: 6 groups (p = 0.858), different types of methods (p = 0.607), the irradiated groups with Gallium Arsenide 6 J/cm<sup>2</sup> and 10 J/cm<sup>2</sup> (p = 0.576) and irradiated with Gallium Arsenide and Aluminium 4 J/cm<sup>2</sup>, 6 J/cm<sup>2</sup> and 10 J/cm<sup>2</sup> (p = 0.77) showed no statistical difference. Thus, despite the chromosomal abnormalities found in the offspring, there was no statistical significance to prove the induction of defects in chromosomes by radiation. Then one should, undertake similar research in pregnant women in order to prove a contraindication to the group.

Key Words: Laser therapy; Gravidic rats; Chromosomal changes; Genotoxic potential.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Tabela 1** – Representação dos indivíduos em seus respectivos grupos, quantidade e tipo de alterações encontradas, sendo: grupo 1 = A6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 2 = A10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 3 = H4: grupo irradiado com 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 4 = H6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 5 = H10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 6 = CCc: controle; sofreram a lesão, mas não foram irradiados.....13

**Figura 1** – Cromossomos mitóticos de filhotes de ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) coradas com Giemsa. A) Metáfase sem alterações, apresentando 2n = 42 cromossomos (2n=40+XX); B) Metáfase apresentando alteração do tipo *gap* (cabeça de seta) e quebra (seta), estando estas alterações em destaque em C. Barra igual 10 µm. Fonte: Arquivo Pessoal.....14

**Gráfico 1** – Média das alterações cromossômicas encontradas por grupo, sendo grupo 1 = A6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 2 = A10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 3 = H4: grupo irradiado com 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 4 = H6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 5 = H10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 6 = CCc: controle; sofreram a lesão, mas não foram irradiados .....15

**Gráfico 2** – Média de alterações cromossômicas verificadas entre os diferentes tipos de Laserterapia: Arsenieto de Gálio (1), Arsenieto de Gálio e Alumínio (2) e o Grupo Controle (3) .....16

**Gráfico 3** - Média de alterações cromossômicas verificadas entre grupos irradiados com Arsenieto de Gálio 6 J/cm<sup>2</sup> (1) e 10 J/cm<sup>2</sup> (2) .....17

**Gráfico 4** – Média de alterações cromossômicas verificadas entre grupos irradiados com Arsenieto de Gálio e Alumínio 4 J/cm<sup>2</sup> (4), 6 J/cm<sup>2</sup> (5) e 10 J/cm<sup>2</sup> (6) .....18

**Figura 2** – Cariótipo da espécie *Rattus norvegicus*. Fonte: Yosida, 1973.....20

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
<b>2.1. Indução das Lesões</b> .....	10
<b>2.2. Aplicação da Laserterapia</b> .....	10
<b>2.3. Análise do Potencial Genotóxico</b> .....	11
2.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos.....	11
2.3.2. Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos .....	11
2.3.3. Coloração com Giemsa.....	12
2.3.4. Microscopia, análise das imagens e interpretação dos dados.....	12
<b>2.4. Análise dos Dados</b> .....	12
<b>3. RESULTADOS</b> .....	13
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	19
<b>5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23
<b>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	25

## 1. INTRODUÇÃO

A Laserterapia de baixa potência (LLLT) vem sendo usada em tratamentos de regeneração tecidual e amplamente aplicada em casos de cicatrizações em diversos tecidos devido a sua propriedade ativadora da proliferação celular. Sua eficácia está relacionada ao fato de a energia do laser fazer com que biomoléculas específicas atinjam um estado de excitação no qual irão sofrer vários tipos de reações e/ou interações, possibilitando o aumento de fatores que são essenciais à cicatrização do tecido (KITCHEN, 1991).

Diversos estudos demonstraram a relação da LLLT com a síntese de colágeno, a indução de angiogênese, o aumento do fluxo sanguíneo, a proliferação de fibroblastos, a diminuição no número de macrófagos, a inibição da proliferação bacteriana e o tratamento para redução da dor e de edema. Tais pesquisas foram realizadas almejando o conhecimento dos efeitos fisiológicos/biológicos e os mecanismos de ação da Laserterapia (KANA *et al.*, 1981), de acordo com a variação da frequência do tratamento, da dosagem aplicada, do tipo de meio gerador da radiação, do tempo da aplicação e dos tecidos aplicados.

Entre os muitos métodos utilizados, destacam-se a Laserterapia com Arsenieto de Gálio (AsGa), Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), Hélio-Neônio (HeNe), entre outros. Mesmo ao utilizando qualquer tipo do laser, a LLLT emite um tipo de radiação não ionizante e não ocasiona efeito térmico no tecido visado, preservando a estrutura do mesmo (KITCHEN, 1991).

Os efeitos adversos da LLLT, contudo, ainda não estão bem compreendidos, podendo diferentes componentes como condições do tecido, características celulares, estado de diferenciação celular e potência do laser, interferir nos resultados da mesma, inclusive apresentando-se danosa ao organismo em si.

Em relação à diferenciação celular, a Laserterapia pode estar associada a estes processos em diferentes tecidos, tais como em osteoblastos, células-tronco mesenquimais, dentre outros (HENRIQUES *et al.*, 2010). Estas hipóteses podem explicar a contraindicação preventiva do tratamento em gestantes, visto que não existem estudos comprovadores dos potenciais riscos da Laserterapia para o feto, o que suscita o questionamento de a aplicação do

laser ser mutagênica, ou não, gerando, neste, alterações cromossômicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Durante a gestação, diferentes tipos de agentes (físicos, químicos e biológicos) podem interferir na viabilidade do conceito, causando alterações na função e/ou morfologia (BUCKER, 2006). Para medir esses danos, tanto no feto quanto na mãe, é necessário compreender o efeito da radiação da Laserterapia.

Para identificação do possível efeito mutagênico da LLLT um dos métodos consiste na análise de alterações no número e/ou deformidades nos cromossomos de *Rattus norvegicus albinus*, em virtude, por exemplo, da simples observação da mutação e fácil manipulação do animal organismo-modelo (KANA *et al.*, 1981).

Tais alterações cromossômicas são erros que ocorrem durante a divisão celular e ocasionam modificações nos cromossomos da célula. Podem ser numéricas (aumento ou diminuição do número de cromossomos) ou estruturais (alteram sequência de genes de um cromossomo), ocorrendo nesta última, diversas alterações como Inversão, Deleção, Duplicação e Translocação (ESTÉCIO *et al.* 2002).

A aplicação da Laserterapia em grávidas poderia, em tese, influenciar na interação da radiação com as células, acarretando diferentes tipos de resposta que comprometeriam a vida dessas células (SEGRETO *et al.*, 1997). Caso tais efeitos sejam identificados na forma de alterações nos cromossomos, pode-se ratificar a contraindicação da LLLT para gestantes.

De modo geral, a utilização da Laserterapia vem sendo contraindicada devido a ausência de estudos específicos voltados para a temática que comprovem sua limitação. Este fato ocorre com a LLLT em gestantes, já que não existem ainda evidências claras que demonstrem se há ou não risco para o feto, indicando a importância desta informação para a saúde de ambos (BUCKER *et al.*, 2006).

Sendo assim, é necessário haver uma avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos após a aplicação do laser em útero gravídico, cuja estimativa será efetuada através da análise de alterações cromossômicas em *Rattus norvegicus albinus* grávidas, considerados organismos-modelo por possuírem grande sensibilidade a agentes tóxicos e devido ao conhecimento



bem fundamentado sobre sua biologia, comportamento e morfologia (FENECH, 2000).

Ao evidenciar tal potencial, seus possíveis efeitos maléficis poderão ser comprovados, facilitando a padronização de cuidados no atendimento direcionado para as gestantes. Caso contrário, estudos adicionais com outros mamíferos são necessários, antes da comprovação de que tal tratamento poderá ser utilizado em grávidas sem implicar em risco para o feto.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Para este trabalho foram utilizadas preparações cromossômicas disponíveis no Laboratório de Citogenômica da Universidade Federal do Amazonas de ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso aproximado de 200 gramas, adquiridas no Biotério do INPA/Manaus – AM. O procedimento experimental não pode ser repetido em função de dois problemas básicos: 1- experimentos não estão podendo ser realizados no Biotério da UFAM; 2- Para que fosse possível a realização do procedimento experimental no INPA, o projeto teve que ser submetido ao Comitê de Ética Local e a aprovação foi obtida apenas no final de maio de 2014 (seis meses após a submissão), com provável liberação das matrizes em julho do corrente ano. Durante o procedimento realizado previamente (ano 2013), as ratas foram acomodadas no mesmo local, em gaiolas individuais com água e alimentação *ad libitum*, sem restrição alimentar especial, ciclo de iluminação claro/escuro 12 horas/12 horas – 6 horas às 18 horas, de acordo com o ciclo sono/vigília do animal, seguindo os princípios éticos de experimentação animal, propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), N° 003/2013 da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sob coordenação da profa. Ayrles Silva Gonçalves Barbosa.

Estas foram separadas aleatoriamente, por sorteio, nos seguintes grupos:

Grupo 1: Possui 7 animais, irradiados com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio).

Grupo 2: Possui 5 animais, irradiados com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio).

Grupo 3: Possui 3 animais, irradiados com 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio).

Grupo 4: Possui 7 animais, irradiados com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio).

Grupo 5: Possui 5 animais, irradiados com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio).

Grupo 6: Possui 2 animais controle; sofreram a lesão, mas não foram irradiados.

Para a intensidade dos lasers de baixa potência (LLLT), foram adotados valores entre 4 e 10 J/cm<sup>2</sup>, uma vez que a faixa de intensidade de 3-8 J/cm<sup>2</sup> é usual para cicatrização de feridas em humanos. A opção do valor 10 J/cm<sup>2</sup> se deve à premissa de que se um valor tão alto não provocar efeito genotóxico ou mutagênico na prole das ratas irradiadas, não haverá riscos para o tratamento de gestantes com Laserterapia.

### **2.1. Indução das Lesões**

Para induzir as lesões os animais foram anestesiados com 50 ml de Ketamina 5%, 10 ml de Rompum e 1 ml de soro fisiológico, com dosagem de 0,1 Ketamina + 0,01 Rompum por 100 g de peso, via injeção subcutânea na região inguinal. Posteriormente, sofreram tricotomia no dorso seguida de assepsia com solução de iodopovidona a 10% (Jonshon Diversey®) ou álcool 70%. Logo após, foi realizada uma incisão cirúrgica com utilização de um “punch” de biópsia de 6 mm de diâmetro (de aço inox da marca Richter LTDA), que retirou tecido cutâneo e subcutâneo dos animais, garantindo que o diâmetro da lesão seja o mesmo para todos. Após cada indução, houve a esterilização do “punch”. Todos os animais do estudo foram anestesiados e tricotomizados, mas somente os grupos específicos receberam a lesão.

### **2.2. Aplicação da Laserterapia**

Após 24 horas de indução das lesões as ratas prenhas foram submetidas à Laserterapia durante toda a gestação, mesmo que a ferida estivesse completamente cicatrizada. Para isto foram utilizados, de acordo com cada grupo: LASER do tipo AsGa e AsGaAl, dose de 4 e 10 J/cm<sup>2</sup>, e de 4, 6 e 10 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente (marca Lasermed – CARCI \_ Ref. 4090); caneta

905nm – radiação infravermelha, com aplicações pontuais sem contato, de modo contínuo, na região central da ferida. Não se fez aplicação na borda da ferida porque isso não traria efeito positivo, uma vez que a intensidade do laser é de dose por centímetro quadrado (1 cm<sup>2</sup>) e a lesão não ultrapassa esse valor, pois foi utilizado um “*punch*” de biópsia com 6 mm de diâmetro para obter as lesões.

### **2.3. Análise do Potencial Genotóxico**

#### **2.3.1. Obtenção de cromossomos mitóticos**

Para a obtenção das preparações cromossômicas mitóticas foi utilizado o protocolo descrito por Ford e Harmerton (1956) com modificações. O animal foi eutanaziado por inalação de éter etílico conforme instruções da Sociedade Norte-Americana de Mastozoologia, “Animal Care and Use Committee, The American Society of Mammalogists” (1998). A seguir os fêmures foram retirados e suas epífises cortadas para a obtenção da medula óssea.

A medula foi levada do interior da diáfise femural para cubetas de vidro, com o auxílio de seringas de 10 mL contendo solução hipotônica de KCl a 0,075M e 0,2 mL de colchicina diluída a 0,0125%. O material foi divulsionado, homogeneizado e mantido em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para que ocorra a hipotonização das células e interrompimento das divisões celulares em metáfase. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de fixador Carnoy recém-preparado na proporção 3:1 (metanol: ácido acético) e realizada uma nova homogeneização. Essa solução foi centrifugada e teve seu sobrenadante desprezado, e o *pellet* resuspenso em fixador. As fixações foram repetidas por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado fixador na proporção de 2:1 em relação à quantidade de sedimento, com nova homogeneização. Por fim o material foi transferido para um tubo de 1,5 ml devidamente identificado com o número do espécime e armazenado em freezer (-10 °C) para posterior análise.

#### **2.3.2. Preparação das lâminas com cromossomos mitóticos**

Para a preparação das lâminas com cromossomos mitóticos, as mesmas foram lavadas, secas ao ar e posteriormente imersas em água destilada a 55° C, em banho-maria. Após cinco minutos, as lâminas foram

retiradas da água de forma a manter uma película de água sobre a sua superfície, na qual a suspensão celular foi gotejada.

### 2.3.3. Coloração com Giemsa

Para a coloração com Giemsa, as lâminas preparadas conforme foram coradas com Giemsa 10%, por 10 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secarem. Em seguida foram analisadas em microscópio óptico.

### 2.3.4. Microscopia, análise das imagens e interpretação dos dados

Todas as preparações citogenéticas clássicas foram analisadas em um microscópio ópticos em objetiva de imersão. As melhores metáfases obtidas foram fotografadas com câmera digital AxioCam ESc, com objetiva de imersão, em microscópio Zeiss em objetiva de imersão, através de um sistema de análise de imagens computadorizado.

Foram analisadas 30 metáfases de cada indivíduo, sendo anotados, além do número diploide, os tipos de aberrações cromossômicas encontradas, tais como quebras (*breaks*), falhas (*gaps*), cromossomos em anel, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos, figuras radiais (IAEA, 2011).

## 2.4. Análise dos Dados

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre grupos independentes. Para os dados com variáveis quantitativas foi efetuada análise de Correlação de Spearman. Todas as análises foram implementadas no programa Statistica 12 (Statsoft). O nível de significância utilizado foi de 0,05.

### 3. RESULTADOS

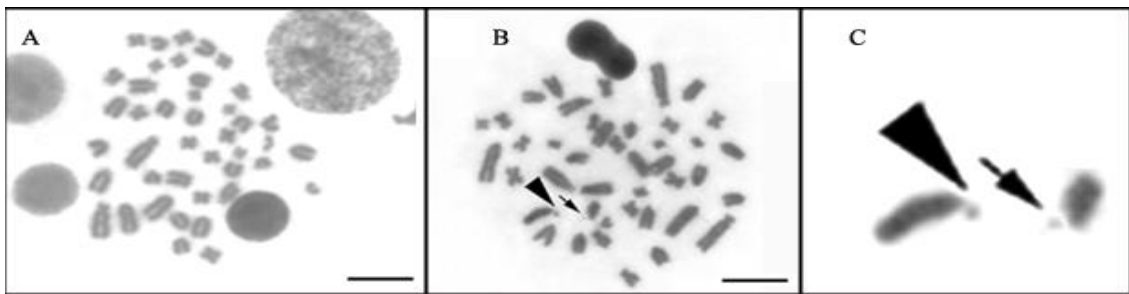
Foram avaliadas 870 metáfases ao total em toda pesquisa, sendo 98,16% (854) normais, e 1,84% (16) portadoras de algum tipo de alteração cromossômica estrutural. Estas metáfases perteceram a 29 indivíduos-filhotes da espécie *Rattus norvegicus albinus*, de mães irradiadas com diferentes intensidades de radiação (**Tabela 1**). Destes, 68,97% (20 filhotes) apresentaram-se como animais portadores de células completamente normais, enquanto em 31,03% (9 filhotes) foi observada alguma alteração estrutural.

Grupo	Animal	Número de células com dano	Tipo de alteração
1	26-1	0	-
1	26-2	0	-
1	28-3	0	-
1	30-2	0	-
1	31-2	1	Gap
1	31-3	1	Quebra
1	33-3	0	-
2	34-1	3	2 Gaps e 1 Quebra
2	35-1	0	-
2	36-2	0	-
2	40-2	0	-
2	41-2	0	-
3	43-1	0	-
3	47-2	2	2 Quebras
3	51-2	0	-
4	53-1	0	-
4	54-3	5	5 Quebras
4	56-3	0	-
4	58-1	1	Gap
4	58-2	1	Quebra
4	59-2	0	-
4	60-3	0	-
5	62-2	0	-
5	64-1	0	-
5	65-3	0	-
5	H10-1	1	Quebra
5	H10-2	1	Quebra
6	TW3-1	0	-
6	TW3-2	0	-

**Tabela 1** – Representação dos indivíduos em seus respectivos grupos, quantidade e tipo de alterações encontradas, sendo: grupo 1 = A6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 2 = A10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 3 = H4: grupo irradiado com 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 4 = H6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl

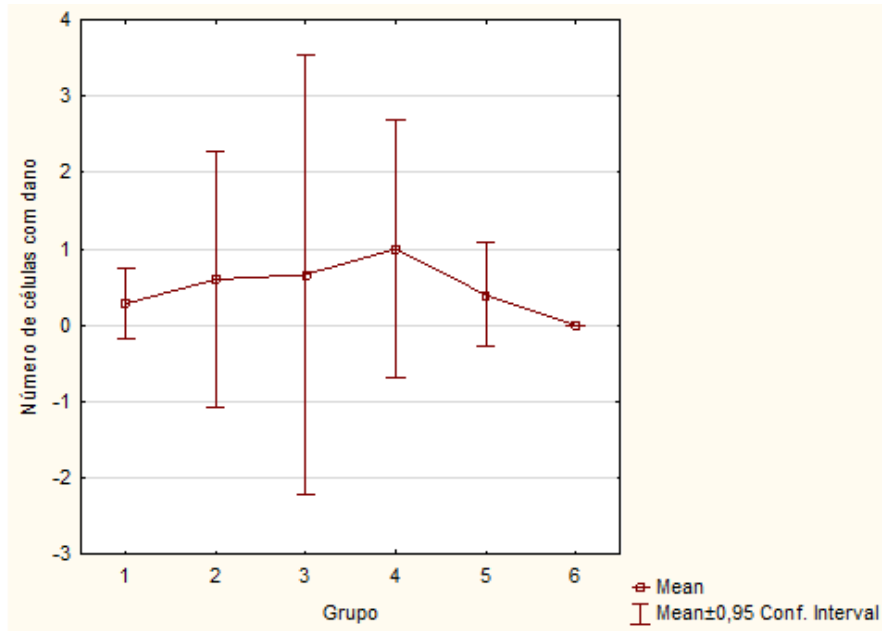
(Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 5 = H10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 6 = CCc: controle; sofreram a lesão, mas não foram irradiados.

O número diploide encontrado em todas as células metafásicas, de todos os indivíduos, foi de 2n=42 cromossomos, sendo 2n = 40 autossomos + XX ou XY. Dentre as alterações cromossômicas encontradas, nenhuma foi do tipo numérica, sendo que 75% (12) tratavam-se de anormalidades do tipo quebra e 25% (4) do tipo falha/gap (**Figura 1**).



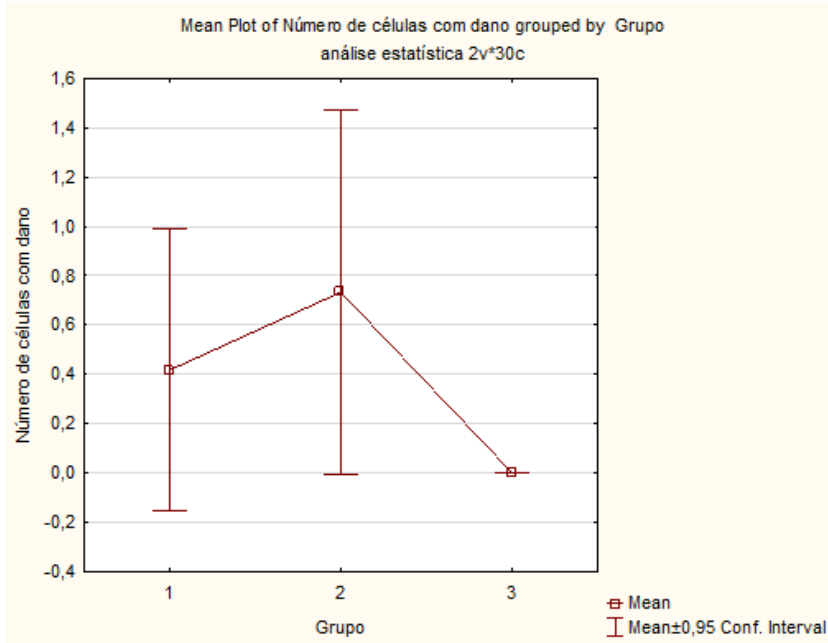
**Figura 1** – Cromossomos mitóticos de filhotes de ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) coradas com Giemsa. A) Metáfase sem alterações, apresentando 2n = 42 cromossomos (2n=40+XX); B) Metáfase com cromossomos apresentando alteração do tipo *gap* (cabeça de seta) e quebra (seta), estando estas alterações em destaque em C. Barra igual 10 µm.

Ao comparar os danos cromossômicos observados entre indivíduos dos diferentes grupos, verificou-se que a média de células por grupo manteve-se entre 0 e 1 (**Gráfico 1**), não havendo diferença estatística entre os mesmos ( $p = 0,858$ ).



**Gráfico 1** – Média das alterações cromossômicas encontradas por grupo, sendo grupo 1 = A6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 2 = A10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa (Arsenieto de Gálio); Grupo 3 = H4: grupo irradiado com 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 4 = H6: grupo irradiado com 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 5 = H10: grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio); Grupo 6 = CCc: controle; sofreram a lesão, mas não foram irradiados.

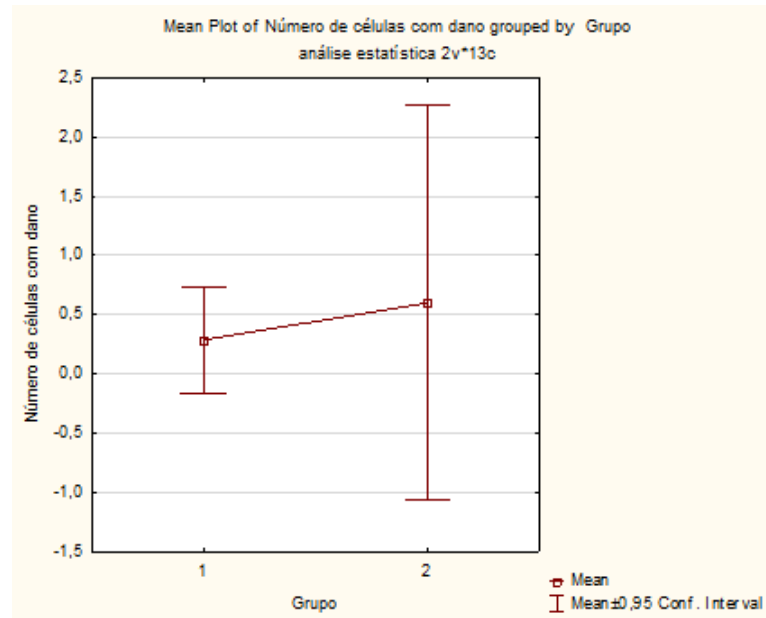
Ao se comparar as médias das alterações cromossômicas entre diferentes tipos de tratamentos aplicados (Arsenieto de Gálio, Arsenieto de Gálio e Alumínio e o Grupo Controle) (**Gráfico 2**), também não foi verificada diferença estatística significativa entre eles ( $p = 0,607$ ).



**Gráfico 2** – Média de alterações cromossômicas verificadas entre os diferentes tipos de Laserterapia: Arsenieto de Gálio (1), Arsenieto de Gálio e Alumínio (2) e o Grupo Controle (3).

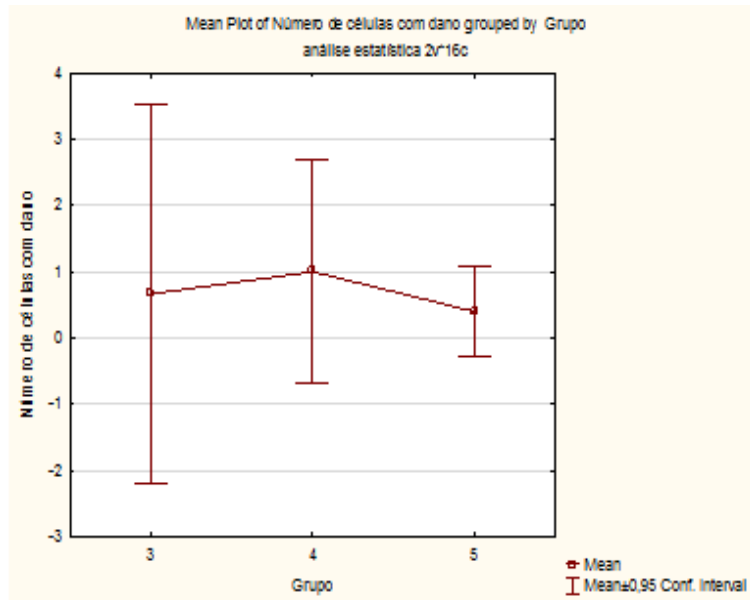


Comparando o número de células com danos entre os grupos das distintas intensidades de Arsenieto de Gálio (6 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>) (**Gráfico 3**), não se visualizou diferença significativa entre ele ( $p = 0,576$ ).



**Gráfico 3** - Média de alterações cromossômicas verificadas entre grupos irradiados com Arsenieto de Gálio 6 J/cm<sup>2</sup> (1) e 10 J/cm<sup>2</sup> (2).

Observando-se a média de alterações cromossômicas entre os grupos das distintas intensidades de Arsenieto de Gálio e Alumínio (4 J/cm<sup>2</sup>, 6 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>) (**Gráfico 4**), também não foi identificada diferença significativa entre eles ( $p = 0,77$ ).



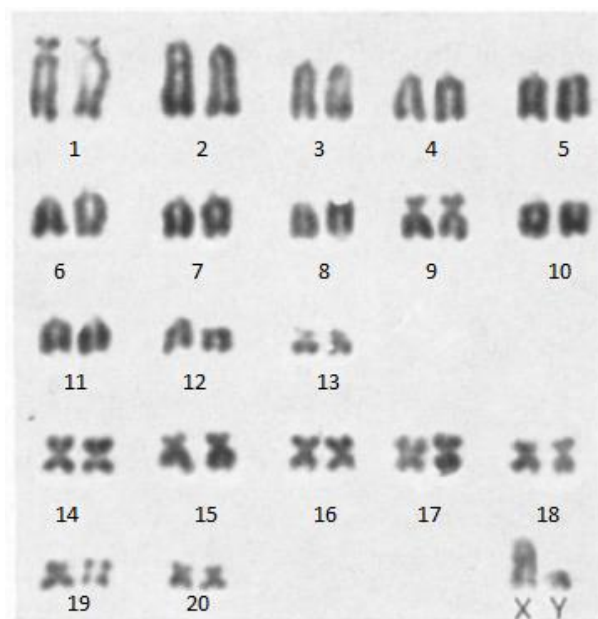
**Gráfico 4** – Média de alterações cromossômicas verificadas entre grupos irradiados com Arsenieto de Gálio e Alumínio 4 J/cm<sup>2</sup> (4), 6 J/cm<sup>2</sup> (5) e 10 J/cm<sup>2</sup> (6).

#### 4. DISCUSSÃO

A Laserterapia de baixa potência (LLLT) é caracterizada por emitir radiação não ionizante, com capacidade de penetração no tecido irradiado sem efeito térmico (KRIPPNER, 1980; GENNARO *et al.*, 1990). Contudo, os efeitos adversos da LLLT não são bem compreendidos e diferentes componentes, como condições do tecido, características celulares, estado de diferenciação celular e potência do laser podem interferir em seus resultados, podendo, inclusive, apresentar-se danosa ao organismo (BOSATRA *et al.*, 1984; HAWKINS *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2012).

*Rattus norvegicus albinus* é considerado um organismo-modelo, em razão de sua ampla utilização na área médica e de biologia experimental, além do conhecimento bem fundamentado de sua biologia, comportamento e morfologia (DONALDSON, 1915). Ademais, são animais dóceis, de fácil manejo, com alta taxa reprodutiva, visto que a gestação dura em torno de 20-24 dias e um novo estro se inicia 18 horas após o parto, durando em torno de 5 dias. Finalmente, por possuírem grande sensibilidade a agentes tóxicos, tanto medicamentosos quanto radioativos, reproduzindo as condições de exposição em humanos, tornando-se a escolha ideal para o estudo da avaliação da genotoxicidade.

Amplamente estudado na Citogenética, o *Rattus norvegicus* apresenta número diploide conhecido igual a 42 cromossomos (**Figura 2**), sendo 13 primeiros pares autossômicos (número 1 ao 13) acrocêntricos e subtelocêntricos, e 7 últimos pares autossômicos (número 14 ao 20) pequenos metacêntricos e submetacêntricos (YOSIDA, 1973).



**Figura 2** – Cariótipo da espécie *Rattus norvegicus*. Fonte: Yosida, 1973.

Comparando os dados obtidos com estes descritos na literatura, foi possível verificar que nenhum dano numérico foi observado em filhotes de ratas submetidos aos diferentes tratamentos. Dos ratos filhotes analisados, tanto os que não exibiram alteração cromossômica (68,97%), quanto os que apresentaram algum tipo de modificação (31,03%), demonstraram número diploide considerado padrão, com  $2n = 40$  cromossomos autossomos + XX/XY.

Com relação às metáfases que apresentaram danos, ainda que tenham sido detectadas modificações dos cromossomos, estas foram estruturais, não sendo observada nenhuma fissão e fusão cêntricas, que implicariam rearranjos cromossômicos numéricos, o que gerariam mudança no número diploide, aumentando-o ou diminuindo-o, respectivamente. Porém, não é possível descartar que este tipo de evento tenha ocorrido após a fecundação, o que poderia ter resultado em inviabilidade do embrião, que nem chega a nascer.

As alterações observadas foram dos tipos quebra cromossômica (75%) ou falha/gap (25%) e não ocorreram sempre nos mesmos pares, o que indica instabilidade genômica nestas metáfases analisado, possivelmente ocorrida em decorrência de agentes exógenos, mais especificamente, a incidência de radiação não ionizante, *in casu*, a Laserterapia. Porém, ressalta-

se que nenhuma alteração fenotípica morfológica foi visualizada nos filhotes portadores destas modificações cromossômicas.

Modificações do tipo quebra e/ou *gap* (sítio frágil que facilita a quebra), como é sabido, são causadas por defeitos no processo de reparação por combinação homóloga (RH), mecanismo de reparo de quebras na dupla fita do DNA (DSBs – do inglês *Double Strand Breaks*) (MOREIRA, 2012). Sendo assim, as alterações encontradas podem indicar que a incidência de radiação, em maior ou menor grau, teria influenciado no mecanismo de reparo RH.

Entretanto, a partir da análise dos grupos irradiados com Arsenieto de Gálio (AsGa), por exemplo, observou-se dentre os 7 indivíduos expostos à 6 J/cm<sup>2</sup>, que 2 (28%) apresentaram 1 alteração cada – 1 quebra ou 1 *gap*. Nos irradiados com 10 J/cm<sup>2</sup> de AsGa, notou-se que 1 dos animais (20%), dos 5 analisados, exibiu 3 defeitos – 1 quebra e 2 *gaps*. Comparando estes dois grupos, não houve diferença estatística entre as duas intensidades aplicadas na Laserterapia com Arsenieto de Gálio (**Gráfico 3**).

Da mesma forma, também não houve demonstrada diferença estatística significativa nos grupos irradiados com Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) com distintas intensidades (**Gráfico 4**). Porém, os filhotes das ratas submetidas a laserterapia com AsGaAl (Arsenieto de Gálio e Alumínio) foram os que apresentaram maior incidência de danos cromossômicos. No grupo submetido à 4 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl, foi observado dentre os 3 animais irradiados, que apenas 1 (33,3%) apresentou 2 modificações cromossômicas – 2 quebras. No grupo em que a radiação 6 J/cm<sup>2</sup> de AsGaAl foi utilizada, observou-se que 3 (42,8%) dos 7 indivíduos exibiram falhas, sendo 5 quebras no primeiro, 1 *gap* no segundo e 1 quebra no terceiro. Por fim, no grupo irradiado com 10 J/cm<sup>2</sup>, notou-se que 2 (40%) dos 5 filhotes demonstraram 1 quebra cada.

Quando comparado os tratamentos com laser e o grupo controle, também não houve diferença significativa entre eles, demonstrando que os tratamentos não causaram danos cromossômicos relevantes, o que sugere que a Laserterapia pode ser utilizada em úteros gravídicos sem potencial teratogênico.

## **5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÃO**

De todo o exposto, ao avaliar estatisticamente o potencial teratogênico da Laserterapia em filhotes de ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), não foi observada diferença entre o grupo controle e os submetidos aos diversos tratamentos. Este fato indica que apesar das alterações cromossômicas encontradas na prole de ratas grávidas, estas não demonstraram ter significância estatística que comprove a indução de defeitos pela radiação nos cromossomos dos filhotes.

Porém, a contraindicação do tratamento em mulheres grávidas não pode ser refutada, uma vez que, para a confirmação da genotoxicidade, o estudo deverá ser reanalisado em amostra significativa de outros mamíferos, incluindo seres humanos, antes da sua aprovação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bosatra, M.; Jucci, A.; Olliano, P. 1984. ***In vitro* fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy.** *Dermatologica*, 168: 157-162.
- Bucker, A.; Carvalho, W.; Alves-Gomes, J.A. 2006. **Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno.** *Acta Amazonica*, 36 (3): 357- 364.
- Donaldson, H H. 1915. ***The Rat: Data and References Tables for the Albino Rat (Mus norvegicus albinis) and the Norway Rat (Mus norvegicus)*.** 6 ed. *The Wistar Institute of Anatomy and Biology*. Philadelphia, 1915, 776p.
- Estécio, Marcos Roberto Higino e Ana Elizabete Silva. **Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores.** *Revista de Saúde Pública* 36.3 (2002): 330-336.
- Fenech, M. 2000. **The in vitro micronucleus technique.** *Mutation Research*, 445: 81–95.
- Fonseca, A.S.; Geller, M.; Filho, M.B.; Valença, S.S.; Paoli, F. 2012. **Low-level infrared laser effect on plasmid DNA.** *Lasers in Medical Science*. 27: 121-30, 2012.
- Ford, C.E.; Hamerton, J.L. 1956. **The chromosomes of man.** *Nature*, 178: 1020-1023. Animal Care and Use Committee. 1988. Guidelines for capture, handling and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogist. *Journal of Mammalogy*, 78: 1416-1431.
- Gennaro, L.; Cardelli, D.; De Luca, G. 1990. L'Anca: **Patologia e Terapia.** Atti IV meeting Temi di Riabilitazione-Ospedale di Medicina Fisica e Riabilitazione "Gervasutta" (Udine 16-17 novembre 1990), Udine: Marioni.
- Hawkins, D.; Houreld, N.; Abrahamse, H. 2005. **Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1056: 486-493.
- Henriques, A.C.G.; Cazal, C.; Castro, J.F.L. 2010. **Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão de literatura.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, [Periódico na Internet], 37 (4) (<http://www.scielo.br/rcbc>). Acesso em: 09/06/2014.

- IAEA 2011. **Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies.** *International Atomic Energy Agency*, Vienna.
- Kana, J.S.; Hutschenreiter, G.; Haina, D.; Waidelich, W. 1981. **Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats.** *Archives of Surgery*, 116: 293-296.
- Kitchen, S.S.; Partridge, C.J. 1991. **A review of low level laser therapy.** *Physioterapia*, 77 (3): 161-168.
- Krippner, S.T. 1980. **Human possibilities – a first person account of mind exploration-including psychic healing, kirlian photography and suggestology – in the USSR and Eastern Europe.** *Doubleday*, 280-281.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A. 1964. **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas*, 52: 201-220.
- Moreira, Marília Borges. 2012. **Aspectos clínicos e citogenéticos da Síndrome de Bloom.**
- Oliveira, R.G.; Oliveira, E.L.P.; Silva, V.C.C.; Barbosa, F.S. 2013. **Proliferação de macrófagos intraperitoniais in vitro, submetidos à laserterapia de baixa potência.** *Fisioterapia Ser*, 8.
- Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.R.; Monteleone-Neto. R. 1991. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação.** *Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 1991, 246p.
- Segreto, Roberto A; Segreto Helena R. C. 1997. **Radiação ionizante e resposta celular.** *Radiol. Bras.* 30 (6): 301-307.
- Yosida, T. H. (1973). **Evolution of karyotypes and differentiation in 13 Rattus species.** *Chromosoma*, 40 (3): 285-297.



## PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEEA



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 003/2013-CEEA/UFAM, intitulado como "Potencial Genotóxico na utilização da Laserterapia em útero gravídico - prole de Ratos Wistar" sob responsabilidade e orientação de **Msc. Ayrles Silva Gonçalves Barbosa**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 03/07/2013.

Manaus, 15 de julho de 2013.

**Profa. Dra. Cíntya Jamille Fritsch Brandão de Oliveira**  
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM  
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013