

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

MILENE BORGES CAMPAGNARO

**EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E TERATOGENICOS DA LLLT:  
ESTUDO EM *ZEBRAFISH***

Porto Alegre

2016

MILENE BORGES CAMPAGNARO

**EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E TERATOGENICOS DA LLLT:  
ESTUDO EM *ZEBRAFISH***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre na área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Porto Alegre

2016

*Dedicatória*



*A Deus por estar presente diariamente em minha vida, sendo um escudo de proteção e força.*

*À minha família pelo incentivo e por me fazer acreditar que todos os sonhos podem se tornar realidade. Mesmo distantes, o amor e o reconhecimento são infinitos.*

## *Agradecimientos*

---



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber**, por toda disponibilidade, atenção e carinho durante esses dois anos do mestrado. Por acreditar em mim. Por ser mais do que um orientador, mas sim um amigo, um apoio e um incentivo diário. Por sempre estar disponível, com sorriso no rosto, e dispensar seu tempo em reuniões e aprendizados extras que a pesquisa nos exigiu. Por ser o responsável por tornar esse sonho, realidade.

À **Profa. Dra. Monica Ryff Moreira Roca Vianna**, pela ajuda, pela confiança e pela disponibilidade em nos ensinar a trabalhar com um novo modelo animal. Por permitir e tornar viável a realização da pesquisa em seu laboratório. Pelo carinho e incentivo nos momentos que não conseguíamos resolver sozinhos os problemas. Pela recepção junto aos seus alunos, tornando viável a realização e desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais **Nicanor e Neusa**, e minhas irmãs **Grazieli e Andressa** que souberam entender todos os momentos de ausência, e sempre me deram forças para continuar.

Ao querido **Eduardo Ribeiro Martiny**, pelo companheirismo e pela compreensão, por estar presente e fazer parte dessa conquista.

## AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, representada pelo magnífico Reitor **Prof. Ir. Joaquim Clotet**, pela qualidade e excelência de ensino prestada aos seus alunos.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Alexandre Bahlis**, pela realização e qualidade do curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – CTBMF.

Ao Ministério da Educação, por intermédio da CAPES, por viabilizar recursos para a realização do curso de Mestrado em Odontologia, na área de concentração em CTBMF, investindo na qualificação de docentes e novos pesquisadores.

Aos professores do Curso de Mestrado em CTBMF da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos recebidos durante o curso.

Aos professores **Ana Luisa de Carvalho, Fábio Dal Moro Maito, Marcia Rodrigues Payeras**, do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pelo carinho e aprendizado durante meu estágio docente.

Aos alunos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Sistema nervoso – Faculdade de Biociências da PUCRS: **Fabiano Peres, Laura Nery, Milene Luzardo, Natália Eltz, Raphaela Fonseca** pelos ensinamentos e pela colaboração e disponibilidade durante a parte experimental deste projeto.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

*Resumo*

---





## RESUMO

A laserterapia de baixa intensidade (LLLT/*Low-Level Laser Therapy*) tem sido amplamente utilizada na Odontologia, tendo em vista seus efeitos locais e sistêmicos, terapêuticos e biomodulatórios sobre os tecidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a embriotoxicidade, a teratogênese e as alterações sistêmicas provocadas pela LLLT, utilizando um laser de diodo (GaAlAs) infravermelho ( $\lambda$ 830nm, 90mW, CW) e vermelho ( $\lambda$ 685nm, 30mW, CW), sobre o desenvolvimento inicial de embriões de *Zebrafish*. Para isso, foram utilizados 1560 embriões, acompanhados desde a fecundação até o 5dpf. Foram realizadas ao longo dos cinco dias de acompanhamento, a avaliação das taxas de eclosão, embriotoxicidade e sobrevivência. As análises como batimento cardíaco, comportamento exploratório, comportamento aversivo, técnica da calceína e técnica do alcian blue foram realizadas somente no final do experimento, no 5dpf. Os animais foram divididos em três grupos. Um grupo com 140 animais e sem aplicação de laser serviu como controle (Ctrl) e dois grupos experimentais, foram irradiados com laser Infra-vermelho (IR) ou com laser Vermelho(R), ambos com 710 animais. Os grupos IR e R foram subdivididos em cinco subgrupos conforme as densidades de energia recebidas: 0.5J, 1.0J, 2.0J, 4.0J, 8.0J, com 142 animais em cada subgrupo. Foram realizadas três sessões de laserterapia, no 1°, 3° e 5°dpf, de acordo com os parâmetros de cada dose utilizada. Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram que nos grupos em que o laser foi aplicado, houve um retardo na eclosão, uma maior mortalidade e presença de alterações teratogênicas dos animais, bem como alterações comportamentais, quando comparados com o grupo controle. Os valores para os batimentos cardíacos foram maiores para os grupos R e IR, quando comparados com o grupo controle, sendo que o grupo IR apresentou os maiores valores. A formação cartilaginosa e óssea não apresentou alterações qualitativas visualmente perceptíveis, se mantendo no padrão de normalidade.

Palavras-chave: *Zebrafish*; laserterapia; LLLT; Odontologia.

*Abstract*

---



## ABSTRACT

The low-level laser therapy (LLLT) has been widely used in Dentistry, considering its local and systemic effects as well as its therapeutic and biomodulatory action on the tissues. Therefore, the aim of this study was to evaluate the embryotoxicity, teratogenesis and systemic alteration caused by LLLT, using a diode laser (GaAlAs) with infrared ( $\lambda$ 830nm, 90mW, CW) and red ( $\lambda$ 685nm, 30mW, CW) wavelengths, in the initial development of the *Zebrafish* embryos. For this, 1560 embryos, monitored from fecundation to 5 dpf, were used and the eclosion, embryotoxicity, and survival rates, were measured. The analysis of the heartbeat, exploratory and aversive behavior, calcein and alcian blue techniques were realized only in the end of the experiment, with 5 dpf. The animals were divided in three groups. One control group (Ctrl) with 140 animals without LLLT, and two experimental groups, with 710 animals each, irradiated with infrared laser (IR) or red laser (R). The experimental groups were subdivided in five subgroups according to the energy densities of energy received (0.5J, 1.0J, 2.0J, 4.0J, 8.0J) with 142 animals in each subgroups. The LLLT was performed in the first, second and fifth dpf, according to the stipulated parameters. The results obtained in the present study showed that in groups with LLLT, there was a delay in the eclosion, a higher mortality rate and the presence of teratogenic Changes in the animals, as well as behavioral alterations, when compared to control group. The heartbeat was higher in both IR and R groups, when compared to the control group, with the IR group showing the highest values. The cartilage and bone formation didn't show any visually alterations, keeping the normality standards.

Keywords: *Zebrafish*; lasertherapy; LLLT; Dentistry.

*Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos*

---



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina-difosfato
ATP	Adenosina-trifosfato
AlGaInP	Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio
ANOVA	Análise de variância
CCE-FO	Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia
CEUA	Comitê de Ética para o uso de animais
cm <sup>2</sup>	centímetros quadrados
Ctrl	Grupo controle
CW	Corrente contínua
DNA	<b>Ácido desoxirribonucléico</b>
DE	Densidade de energia
DT	Densidade total
dpf	Dias pós-fecundação
f	Frequência
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
He-Ne	Hélio- Neônio
hpf	Horas pós-fecundação
IR	Infrared <i>Laser</i> ( <i>Laser</i> infravermelho)
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
LLLT	Low-Level Laser Therapy (Laserterapia de Baixa Intensidade)
min	minuto
m/s	metros por segundo
mW	Miliwatt
Nm	Nanômetro
P	Potência
PBST	Solução tampão fosfato salino tween
PTU	Phenylthiourea (Feniltiourea)
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
R	Red <i>Laser</i> ( <i>Laser</i> vermelho)
RNA	Ácido ribonucléico
s	segundos
W	Watt

$\lambda$	Comprimento de onda
®	Marca registrada
%	Porcentagem / Porcento / Percentual
200x	Aumento de 200 vezes

## *Sumário*

---



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISTA DE LITERATURA .....	21
2.1 RADIAÇÃO <i>LASER</i> .....	21
2.2 LLLT – LOW-LEVEL LASER THERAPY.....	22
2.3 EFEITOS SISTÊMICOS DO <i>LASER</i> .....	28
2.4 <i>Zebrafish</i> .....	37
7 CONCLUSÃO .....	40
9 ANEXOS .....	42
9.1 ANEXO A - Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS .....	42
9.2 ANEXO B - Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA-PUCRS).....	43



## *Introdução*

---



## 1 INTRODUÇÃO

O laser é um dispositivo que gera um feixe de luz especial, uma forma de irradiação não-ionizante, a qual possui características que a identificam e a tornam diferente de outras fontes luminosas. Estas características são: monocromaticidade, polarização, coerência e colimação. Além disso, suas características dependem de vários parâmetros, como comprimento de onda ( $\lambda$ ), potência (P), densidade de energia (DE), tipo de feixe e modo de aplicação (CARRINHO, 2004).

O laser pode ser dividido em duas categorias conforme suas indicações terapêuticas: Lasers de baixa potência ou terapêuticos (*Low Level Laser Therapy / LLLT* – Laserterapia de baixa intensidade) e Lasers de alta potência ou cirúrgicos (*High Level Laser Treatment / HLLT*) (LINS et al., 2011).

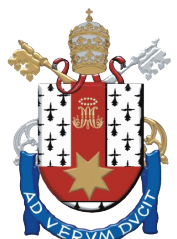
A utilização do laser na clínica odontológica é muito ampla estando indicada para tratamentos cirúrgicos diversos, hipersensibilidade dentinária, lesões aftosas recorrentes, herpes, bem como coadjuvante em terapias de reparo tecidual. O laser está ligado à capacidade de estimular processos moleculares e bioquímicos, envolvidos no processo de reparo celular e tecidual, estimulando a regeneração, aumentando a proliferação celular e, conseqüentemente, a cadeia de reparo tecidual, desde a formação de tecido de granulação, colágeno, remodelação e reparo ósseos, restaurando as funções hormonais normais, modulando e regulando o sistema imune, podendo reduzir a inflamação, o edema e a dor (PINHEIRO, 2006; GAO, XING, 2009; AL GHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012; FRONZA et al., 2013).

O princípio básico do laser está fundamentado na irradiação de uma luz monocromática, a qual apresenta um comprimento de onda capaz de afetar o

comportamento das células sem superaquecê-las, podendo estimular ou inibir as atividades fisiológicas, proliferativas e bioquímicas envolvidas com a biomodulação. Todo processo vai depender da energia, distância de aplicação, tempo de exposição e tipo de tecido envolvido (RODRIGO et al., 2009).

Embora existam vários estudos sobre o uso da LLLT na Odontologia, estes tem, na sua grande maioria, o objetivo de avaliar os efeitos locais. As ações sistêmicas da LLLT ainda geram muitas discussões e incertezas, uma vez que não existem protocolos definidos para sua utilização nas aplicações clínicas, dificultando a comparação e o conhecimento dos reais efeitos provocados pela irradiação.

Assim, o presente trabalho se propõe investigar os efeitos embriotóxicos e teratogênicos da LLLT, relacionados com a exposição a diferentes doses e diferentes comprimentos de onda do laser durante o desenvolvimento inicial do *Zebrafish*, bem como as possíveis alterações sistêmicas avaliadas principalmente através da eclosão, sobrevivência, batimentos cardíacos e comportamento dos animais.



## 2 REVISTA DE LITERATURA

### 2.1 RADIAÇÃO LASER

A palavra *LASER* é um acrônimo de “*Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, que significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação” (CARRINHO, 2004).

O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética, no espectro luminoso que vai do infravermelho ao ultravioleta, com características muito especiais, que a diferenciam das demais fontes luminosas e permite uma alta transferência de energia aos tecidos irradiados, permitindo seu emprego em diversas terapias e em diversas áreas (CARRINHO, 2004; LINS et al., 2004).

Dentre as características que tornam a luz laser especial, está a monocromaticidade, a coerência e a colimação, além dos parâmetros que a caracterizam que são o comprimento de onda, a potência, a densidade de energia, o tipo de feixe e a forma de aplicação (CARRINHO, 2004).

A monocromaticidade significa que sua radiação é produzida somente por uma cor, ou seja, os fótons, partículas de carga luminosa, tem o mesmo comprimento de onda. A coerência é observada quando a luz é formada por ondas de mesma frequência e direção, que mantem uma fase constante entre si, onde as cristas e os vales da trajetória coincidem em direção, amplitude e comprimento, existindo assim uma previsibilidade de trajetória e direção com ondas sempre alinhadas. A colimação é o processo que torna o mais paralela possível as trajetórias de cargas luminosas, tornando a luz unidirecional, o que permite ter um ponto focal, no qual se obtém a

maior densidade de energia . (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; CARRINHO, 2004; GENOVESE, 2007).

Quanto à terapêutica, o laser pode ser dividido em dois grandes grupos, os lasers de baixa potência ou terapêuticos (LLLT) e os lasers de alta potência ou cirúrgicos (HLLT). A LLLT altera minimamente a temperatura, sendo quase imperceptível, ao passo que a HLLT, é capaz de elevar a temperatura tecidual ao ponto de cortar e vaporizar tecidos (LINS et al., 2011; AL GHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012).

A interação do laser com o tecido é determinada por fatores como a composição do seu meio ativo, o comprimento de onda, a potência, a quantidade de energia depositada no tecido, a forma de emissão (contínua ou pulsada), a duração e a quantidade de sessões utilizadas. Além disso, sabe-se que os componentes distintos de cada tecido irradiado e seus componentes citoplasmáticos (água, proteínas, lipídios, carboidratos e eletrólitos) vão determinar as especificidades com relação ao coeficiente de absorção e difusão de cada tecido (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

## 2.2 LLLT – LOW-LEVEL LASER THERAPY

A LLLT tem empregado vários comprimentos de onda dentro do espectro visível e infravermelho. Inicialmente, os estudos enfatizavam a luz visível, com meio ativo gasoso, como hélio-neônio, rubi, argônio e criptônio. Mais recentemente os *lasers* de diodos semicondutores têm sido utilizados com comprimentos de onda dentro dos espectros vermelho e infravermelho, sendo que os mais comuns são o *laser* de

arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) e o *laser* de fosfeto arseneto de gálio e índio (InGaAsP) (BASFORD, 1995; PONTINEN, 1992; WALSH, 1997b).

Os *lasers* de HeNe e GaAlAs podem ser relativamente mais eficazes na bioestimulação quando comparados com os *lasers* cirúrgicos. Isso se deve ao fato dos comprimentos de onda estarem próximos à maior taxa de absorção pelos pigmentos biológicos da pele como a hemoglobina e citocromos mitocondriais (BRAVERMAN et al., 1989).

Na Odontologia, a LLLT é amplamente utilizada no reparo cicatricial de feridas, no tratamento de hipersensibilidade dentinária, em pericoronarites, aftas, herpes simples, sinusites, além de ser empregada como coadjuvante no estímulo à vascularização, analgesia pós-operatória ou em pacientes com disfunção temporomandibulares e também na regeneração nervosa (WALSH, 1997a).

A LLLT tem sido amplamente utilizada, tanto isoladamente como coadjuvante de outros tratamentos quando efeitos biológicos locais são esperados, já que dentre suas funções encontram-se a modulação de células do sistema imunológico, a liberação de endorfinas, a melhora na microcirculação, a proliferação e a migração celular (LINS et al., 2011) bem como efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatriciais (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003; LINS et al., 2010; HENRIQUES et al., 2014).

A LLLT é utilizada também para acelerar processos de reparo em tecidos moles e duros devido a seu efeito biomodulador (AL GHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012), relacionado com o aumento da proliferação celular, uma vez que tem a capacidade de estimular a cadeia respiratória mitocondrial. O número de mitocôndrias da célula varia conforme a demanda de energia necessária para seu funcionamento, o *laser*

pode agir liberando a energia armazenada na forma de ATP (Adenosina-trifosfato), aumentando a síntese e a produção de ATP e, conseqüentemente, a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) e proteínas. (GAO e XING, 2009; HENRIQUES et al., 2014).

A bioestimulação depende de parâmetros relacionados com o comprimento de onda do *laser*, a dose, a potência e o tempo de irradiação, bem como com o tipo de célula irradiada e as características fisiológicas das células no momento da irradiação. A interação da luz *laser* com os tecidos pode estimular ou inibir a proliferação celular, além de impedir a apoptose. Em doses baixas, estimula a proliferação celular e, em doses elevadas, pode suprimir o crescimento celular. Ao se utilizar uma dose baixa, a luz é absorvida pela cadeia respiratória, e doses de cálcio são transportados para o citoplasma provocando estímulo de vários processos biológicos como síntese de DNA, RNA, mitose e proliferação celular. Entretanto, quando doses elevadas de *laser* são utilizadas ocorre um aumento na liberação do cálcio, reduzindo ou anulando o ATP da célula, ocorrendo a inibição do metabolismo celular (SMITH, 1990; SCHINDL et al., 2000, AL GHAMDI, KUMAR e MOUSSA, 2012; FRONZA et al., 2013).

Muitos estudos ao longo do tempo têm avaliado a LLLT isoladamente ou concomitante ao tratamento proposto. Os estudos variam com relação ao tipo de laser utilizado, à espécie exposta, ao tempo de acompanhamento do experimento, à dose de irradiação utilizada, ao tipo de célula exposta e o momento em que essa célula se encontra, bem como o tipo de tecido exposto à irradiação. Em torno dessa infinita variabilidade, efeitos locais e sistêmicos são analisados, bem como, as várias alterações biológicas presentes (RODRIGO et al., 2009).



A transmissão da irradiação de *laser* na pele humana depende de fatores individuais para cada camada de pele. Uma parte da luz do *laser* é refletida ao atingir a pele, a outra parte da luz penetra nas camadas mais profundas, onde poderá sofrer dispersão ou absorção conforme o tecido. Na pele, a absorção é predominantemente na derme e epiderme, enquanto que a dispersão ocorre por fibras colágenas nas camadas mais profundas (KOLÁROVÁ, DITRICHOVÁ e WAGNER, 1999). As principais estruturas responsáveis pela absorção dos *lasers* vermelho e infravermelho são as proteínas. Estudos sugerem que elementos mitocondriais são cromóforos e absorvem a energia do *laser*. A penetração da LLLT pode ser de 5 a 10 mm, e pode afetar tanto estruturas superficiais como as mais profundas, mas sempre há uma dispersão múltipla irradiada, influenciando a distribuição final da energia (WALSH, 1997a).

A penetração e dispersão da luz visível e da radiação ultravioleta na pele dependem muito do comprimento de onda utilizado e das propriedades ópticas das camadas da pele individualmente. Na epiderme, a absorção é realizada principalmente pela melanina. O comprimento de onda entre 400nm e 600nm é absorvido na derme por cromóforos do sangue como a hemoglobina, a oxi-hemoglobina, a bilirrubina e o caroteno. Já nos comprimentos de onda entre 700nm e 1300nm a absorção é fraca por componentes do sangue, com baixa dispersão na derme (KOLÁROVÁ, DITRICHOVÁ e WAGNER, 1999). Enquanto o *laser* infravermelho apresenta um maior poder de penetração nos tecidos subcutâneos, em função de sua baixa absorção pela água ou por pigmentos da pele, o *laser* vermelho, apresenta menor poder de penetração, uma vez que sofre absorção por pigmentos e líquidos e maior dispersão na camada superficial.

No estudo realizado por Loncar et al. (2011), pacientes com xerostomia foram tratados com *laser* GA-As ( $\lambda=904\text{nm}$ ), com irradiação bilateral nas glândulas parótida, submandibular e sublingual. Dos 50 pacientes, 34 receberam o tratamento e 16 foram designados para o grupo controle (sem receber irradiação). O grupo controle utilizou somente um bochecho de ácido cítrico 2% por 30 segundos diariamente, na tentativa de estimular o fluxo salivar. O grupo *laser*, foi exposto a 10 sessões de laserterapia, diariamente, com duração de 120 segundos e  $DE=29,5\text{J}/\text{cm}^2$ , direcionadas intra e extra oralmente para as glândulas salivares maiores. Foi realizada análise pelo fluxo salivar, e os autores concluíram que a LLLT estimulou uma maior produção salivar no grupo *laser*, quando comparado ao grupo controle, de forma regenerativa ao longo do tempo.

Para Bayram et al. (2013), a utilização da LLLT em abordagens cirúrgicas com pacientes que utilizam bisfosfonatos é pouco conhecida devido a carência de estudos clínicos relacionados com o efeito mais comum causado por essas medicações, a necrose dos maxilares. Com isso, nesse estudo, foi investigado os efeitos da LLLT sobre a proliferação celular, sobre a fosfatase alcalina e sobre as Saos-2 (células semelhantes a osteoblastos humanos), tratados com diferentes doses de Zolendronato. Foram utilizadas cultura de células, separadas em dois grupos, as quais receberam diferentes doses do medicamento. Um grupo foi irradiado após 24h e o outro após 48h do tratamento, ambos recebendo uma dose de irradiação com laser de diodo ( $\lambda=808\text{nm}$ , tempo=10s e  $P=0,25-0,50\text{W}$ ). Após a LLLT, as células permaneceram por mais 48h no seu ciclo normal de desenvolvimento, e então, foram analisadas. Os autores puderam concluir que a utilização de LLLT apresentou um efeito bioestimulador sobre as células (Saos-2) mesmo após o tratamento com o

zolendronato, podendo ser útil no tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida pelos bisfosfonatos.

Henriques et al. (2014), avaliaram os efeitos da LLLT na proliferação, invasão e expressão de ciclina D1, E-caderina,  $\beta$ -catenina e MMP-9 em células de um carcinoma escamoso de língua (SCC25). A irradiação das células foi realizada com *laser* de diodo ( $\lambda=660\text{nm}$ ,  $DE=0.5$  e  $1.0\text{J}/\text{cm}^2$ ). Os autores observaram que a LLLT induziu significativamente a proliferação de células, através do aumento de ciclina D1 e  $\beta$ -catenina, ao mesmo tempo que reduziu a expressão de E-caderina e de MMP-9, promovendo invasão SCC25. Os resultados demonstram que a LLLT estimulou a proliferação e invasão do carcinoma. Quando aplicado em células benignas, o *laser* tem efeitos benéficos, uma vez que a proliferação celular contribui para a cicatrização e reparo ósseo, muscular e neural. Em contrapartida, quando utilizado em células neoplásicas, as quais apresentam instabilidade genômica, pode haver um crescimento dessas células geneticamente alteradas, havendo maior proliferação e, indiretamente, um aumento das mutações adicionais durante o processo natural da carcinogênese. Evidências sugerem que esse processo seja resultado da alteração de expressão de proteínas ligadas à regulação do ciclo celular, da apoptose, da migração celular, da degradação de matriz extracelular e da angiogênese.

No estudo de Sancakli et al. (2015), a LLLT foi utilizada em pacientes com distúrbios temporomandibulares, de origem não dentária, que apresentavam dor e limitação de movimentos mandibulares. Este foi um estudo clínico randomizado, onde 30 pacientes foram divididos em 3 grupos submetidos a 12 sessões de LLLT (*laser* de diodo -  $\lambda=820\text{nm}$ ,  $P=300\text{mW}$ ,  $DE= 3\text{J}/\text{cm}^2$ ), em período de um mês. No Grupo I o *laser* foi aplicado no ponto de maior dor, no Grupo II em pontos pré-estabelecidos da musculatura e no Grupo III foi feita uma aplicação com o aparelho desligado (controle).

Nos grupos com LLLT, houve redução significativa da dor à palpação e os movimentos mandibulares melhoraram, sendo que o grupo I apresentou os melhores resultados em todas as análises realizadas quando comparado ao grupo II. O grupo controle não apresentou diferença estatisticamente significativa. O estudo concluiu que a LLLT pode ser aceita como uma alternativa no tratamento de distúrbios temporomandibulares, e que a irradiação direta no ponto de dor é mais eficaz.

Acar et al. (2016) compararam a ação da LLLT com a LIPUS (Low-intensity pulsed ultrasound) no reparo ósseos em defeitos realizados em calvárias de coelhos. Foram utilizados 16 coelhos, divididos em 4 grupos, com duração de duas semanas de tratamento. Laser GaAlAs ( $\lambda=810\text{nm}$ ,  $P=0,1\text{mW}$ ), LIPUS ( $f=1,5\text{MHz}$ ,  $P=30\text{mW/cm}^2$ ). O Grupo A foi o controle, o Grupo B recebeu LLLT em seis sessões com doses de  $4\text{J/cm}^2$  em cada aplicação, o Grupo C recebeu LIPUS em seis sessões realizadas com dose de  $30\text{mW/cm}^2$  em cada aplicação e, finalmente o Grupo D recebeu uma combinação de LLLT com LIPUS em seis sessões com intervalo de 12h entre uma aplicação e outra. O tratamento iniciou 24h após a cirurgia com 3 sessões por semana. Os autores concluíram que nos grupos com tratamentos isolados houve uma melhor cicatrização quando comparados ao grupo controle, e que o grupo D não apresentou um efeito aditivo na regeneração óssea.

### 2.3 EFEITOS SISTÊMICOS DO LASER

Muitos estudos relatam os efeitos sistêmicos provocados pela LLLT em pontos distantes ao local irradiado. Entretanto, torna-se difícil estipular comparações com base nos resultados desses estudos, uma vez que os parâmetros de irradiação,

os tecidos irradiados e o tempo total de tratamento são muito variáveis e não permitem uma forma objetiva de medir os reais efeitos provocados (RODRIGO et al., 2009).

Muitos benefícios, incluindo à estimulação ou inibição de atividades fisiológicas, bioquímicas ou proliferativas, estão associados à bioestimulação com a utilização da LLLT. Os efeitos podem ser dose-dependentes, benéficos ou prejudiciais, dependendo da energia instituída e do tecido irradiado. Não necessariamente a irradiação precisa ser direta, num ponto específico, já que os efeitos podem ser distantes do local irradiado (RODRIGO et al., 2009). Essa biomodulação que ocorre nos tecidos afastados do ponto focal de irradiação, ocorre possivelmente pela associação do aumento de mitoses, capaz de modular a fisiologia das células, aumentar a proliferação celular, a atividade osteoblástica (neoformação óssea), a vascularização e a deposição de colágeno. Somado a isso, pode-se observar ainda efeitos analgésicos e anti-inflamatórios (CARRINHO, 2004; LINS et al., 2011; COELHO et al., 2014).

Braverman et al. (1989), avaliaram os efeitos bioestimuladores da radiação com *laser* de He-Ne ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ), GaAIs ( $\lambda=904\text{nm}$ ) e de ambos combinados na cicatrização de feridas realizadas no dorso da pele de coelhos. Setenta e dois coelhos foram divididos em quatro grupos (18 animais por grupo). O Grupo 1 sem LLLT; o Grupo 2 foi irradiado com o *laser* de HeNe ( $DE=1,65\text{J}/\text{cm}^2$ ), o Grupo 3 foi irradiado com *laser* de GaAIs ( $DE=8,25\text{J}/\text{cm}^2$ ) e o Grupo 4 uma combinação dos dois *lasers*. A irradiação foi aplicada diariamente em uma das duas feridas dorsais, por 21 dias. Diferenças significativas foram encontradas em todos os grupos irradiados com relação ao grupo controle, quanto à relação de resistência à tração, tanto na ferida irradiada diretamente, quanto na que não recebeu irradiação direta. O crescimento da epiderme foi maior no grupo do *laser* de HeNe quando comparada ao grupo controle,

mas sem diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a irradiação, tanto isoladamente quanto de forma combinada dos dois tipos de *lasers* aumentou a resistência durante a cicatrização das feridas e podem ter liberado fatores teciduais na circulação sistêmica, aumentando a força à tração (resistência tecidual) na ferida contralateral.

Rochkind et al. (1989) pesquisaram o efeito sistêmico do *laser* HeNe na recuperação de lesões em sistema nervoso periférico e central em ratos. Foram divididos em dois grupos, um controle (não irradiado) e um grupo laser. Feridas cutâneas bilaterais foram provocadas por queimaduras nos animais, e a LLLT ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ,  $P=16\text{mW}$  e diferentes DE) aplicada por 21 dias, somente na ferida do lado direito. Os resultados mostraram uma melhora em ambas as feridas do grupo irradiado, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, o grupo controle apresentou necrose avançada e gangrena bilateral. O efeito sistêmico também foi encontrado na avaliação da medula espinhal. Nervos ciáticos que sofreram esmagamento receberam terapia com *laser*, e foi observado uma degeneração menor no grupo irradiado com *laser* HeNe. Os autores concluíram que o *laser* HeNe pode exercer um efeito sistêmico na pele, nos tecidos adjacentes, bem como em nervos periféricos severamente lesados na região da medula espinhal. Observaram ainda que os efeitos persistiram por longos períodos após aplicação da laserterapia.

Van Breugel e Dop Bär (1992) avaliaram os efeitos individuais da potência e do tempo de exposição do *laser* em fibroblastos humanos, avaliando a proliferação e produção de colágeno tipo I *in vitro*. Os fibroblastos foram submetidos ao *laser* HeNe ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ), variando a densidade de energia e o tempo de exposição. A irradiação foi realizada durante três dias consecutivos, cujo tempo variou entre 0,5 e 10 minutos e a potência entre 0,55 e 5,98mW. Foram realizados vários experimentos, onde o

número de células e a produção de colágeno I foram observados. Os resultados mostraram que o *laser* com potências abaixo de 2,91mW melhorou a proliferação celular (observada pela contagem de células), ao passo que potências maiores que 5,98mW não apresentaram este efeito. Efeitos estimuladores foram melhores com tempos de irradiação entre 0,5 e 2 minutos. Já a produção de colágeno tipo I foi oposta, quando aumentou a proliferação celular, diminuiu a produção de colágeno tipo I. Com isso, ficou evidente que o tempo de exposição e a densidade de energia são responsáveis pela determinação do efeito do *laser*. A estimulação ou inibição de propriedades celulares podem ser obtidas com o mesmo *laser*, nas mesmas células, variando a DE e o tempo de exposição.

Morimoto et al. (1994) avaliaram a influência da irradiação do *laser* de argônio de baixa intensidade sobre a respiração mitocondrial *in vitro*. Vários comprimentos de onda foram utilizados (351nm, 458nm e 514,5nm) e o consumo de oxigênio mitocondrial foi mensurado durante a irradiação. Os resultados sugeriram que os *lasers* com  $\lambda=351\text{nm}$  e  $\lambda=458\text{nm}$  aceleraram o consumo de oxigênio da mitocôndria, ao passo que no *laser* com  $\lambda=514,5\text{nm}$  isso não foi observado. Com base nos resultados os autores concluíram que a radiação *laser* com comprimentos de onda de 352nm e 458nm podem danificar a membrana interna da mitocôndria, enquanto que, o comprimento de onda de 514,5nm pode melhorar levemente a taxa de síntese de ATP.

A LLLT quando utiliza comprimentos de onda entre 600nm e 1000nm, potência entre 5 e 500mW, não produzem calor no tecido atingido. Em contrapartida, provocam reações fotoquímicas e fotofísicas alterando a normalidade da célula. Os fótons com luz vermelha ou infravermelha são absorvidos por receptores no tecido. As alterações na membrana celular alteram a permeabilidade, aumentando a síntese

de ATP e outras atividades metabólicas. As alterações químicas causadas pelo *laser*, tanto a nível de membrana celular, como a nível de núcleo da célula, provocam aumento da vasodilatação local, angiogênese, produção de fibroblastos, síntese de colágeno, produção de linfócitos T e B, liberação de endorfinas locais e alterações nas prostaglandinas locais. Este tipo de terapia é utilizada para estimulação da cicatrização nos tecidos moles e duros, agindo como anti-inflamatório e alívio da dor, além de estimular o sistema imune a fim de atenuar os efeitos infecciosos (FRANKS, 1999).

Kolárová, Ditrichová e Wagner (1999) avaliaram os parâmetros ópticos no uso de fototerapia utilizando um *laser* de HeNe ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ,  $P=50\text{mW}$ ) e um *laser* semiconductor ( $\lambda=675\text{nm}$ ,  $P=21\text{mW}$ ). A distribuição de radiação foi detectada por uma câmera CCD e avaliada pelo software DIPS. Amostras de pele de 11 homens, com idade entre 16 a 40 anos, submetidos à cirurgia foram estudadas *in vitro*. Além de pele, amostras de tecido granular de úlceras femurais foram utilizadas para avaliar as diferenças ópticas da penetração da luz *laser* nos diversos tecidos. Os autores observaram que a penetração e a dispersão da radiação ultravioleta e luz visível na pele dependem no comprimento de onda, da fonte de emissão e das propriedades ópticas individuais das camadas de pele. Na pele, a absorção foi predominante na derme e epiderme (através da melanina), enquanto nas camadas mais profundas ocorreu o espalhamento através das fibras colágenas. Os autores observaram ainda que com comprimentos de onda entre 400 e 600nm o *laser* foi absorvido na derme por cromóforos da pele (hemoglobina, oxi-hemoglobina, bilirrubina e caroteno). Uma pobre absorção pelo sangue ocorreu com comprimentos de onda entre 700 a 1300nm, com pouca dispersão na derme. Aproximadamente 0,3% do *laser* HeNe e 2,1% do *laser* semiconductor penetraram nas amostras, padronizadas com 19mm de



espessura. O tecido de granulação apresentou propriedades ópticas significativamente diferentes e a penetração do *laser* foi quase 2,5 vezes maior do que a penetração na pele normal com espessura semelhante, devido às diferenças histológicas estruturais. Diferenças também foram encontradas entre tecidos normais de distintas regiões do corpo. Os autores concluíram que a penetração do *laser* na pele é um fator decisivo para a seleção da dose de sua radiação.

A LLLT pode provocar alterações sistêmicas em processos de cicatrização de feridas. Maegawa et al. (2000) estudaram, *in vitro*, a influencia da LLLT na microcirculação mesentérica, bem como na concentração sistólica de cálcio em células do músculo liso vascular de ratos. Foi utilizado um *laser* com  $\lambda=830\text{nm}$  e  $\text{DE}=38,2\text{mW/mm}^2$ . A laserterapia causou importante dilatação nas arteríolas irradiadas, levando a um aumento significativo do fluxo sanguíneo arteriolar. Os autores concluíram que as alterações circulatórias observadas parecem ter sido mediadas em grande parte pela redução do íon cálcio intracelular nas células musculares dos vasos, induzidas pela laserterapia. As reações vasculares induzidas pela LLLT podem ser consideradas possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito clínico do *laser*, uma vez que o reparo tecidual em feridas e o alívio da dor tem íntima relação com a circulação sanguínea. Se houver melhoria na vascularização com o uso do *laser*, possivelmente haverá melhora nos sintomas e no reparo cicatricial.

Para avaliar a capacidade anti-inflamatória da LLLT, Freitas et al. (2001) avaliaram os níveis de inflamação e mediram a presença da proteína C-reativa (PCR), que aumenta nos processos inflamatórios. Foi utilizado um *laser* de diodo infravermelho ( $\lambda=830\text{nm}$ ; Corrente contínua (CW); tempo de exposição: 2 min) no pós-operatório de exodontias de terceiros molares retidos e a PCR foi usada como marcador de inflamação. Os 24 pacientes foram divididos aleatoriamente em dois

grupos com doze indivíduos cada. No primeiro grupo os pacientes receberam irradiação com  $DE=4,8J/sessão$ , 24 e 48h após a cirurgia. No segundo grupo os pacientes foram submetidos a uma falsa irradiação com o mesmo protocolo do grupo teste e serviram como controles. Amostras de sangue foram coletadas antes do procedimento cirúrgico e após 48 e 72 horas. Os valores da PCR no grupo irradiado com 48 horas (0,320mg/dl) foram simétricos e bem menores quando comparados com o grupo controle (0,862mg/dl), mas sem diferença estatisticamente significativa. Entretanto, após 72 horas do procedimento cirúrgico, os valores da PCR foram semelhantes para o grupo irradiado (0,272mg/dl) e para o Grupo Controle (0,608mg/dl), provavelmente devido à tendência natural da redução dos níveis de PCR nessa fase. Os autores concluíram então, que a redução nos níveis de PCR no grupo *laser*, pode indicar uma atenuação no processo inflamatório.

Rodrigo et al. (2009) em um estudo com ratos Wistar, avaliaram a ação sistêmica e o processo de reparo em feridas provocadas e tratadas com LLLT. Quatro grupos, com nove animais cada, foram divididos em Grupo controle (sem *laser*), Grupo com *laser* vermelho (AlGaInP,  $\lambda=685nm$ ,  $P=30mW$ ,  $DE=20J/cm^2$ ), Grupo com *laser* infravermelho (GaAlAs,  $\lambda=830nm$ ;  $P=50mW$ ;  $DE=20J/cm^2$ ) e um Grupo com ambos os *lasers* (GaAlAs,  $\lambda=830nm$ ;  $P=50mW$ ;  $DE=10J/cm^2$  e AlGaInP,  $\lambda=685nm$ ,  $P=30mW$ ,  $DE=10J/cm^2$ ). Três feridas foram provocadas no dorso, uma próximo à cabeça, outra próximo à cauda e uma no espaço central. O *laser* foi aplicado somente na ferida mais próxima à cabeça. Os autores observaram que no grupo com *laser* vermelho e infravermelho, a cura foi mais avançada na ferida localizada mais afastada do ponto de aplicação do *laser*, concluindo, assim, que a aplicação combinada de *lasers* resultou em um efeito sistêmico mais evidente no reparo de feridas cutâneas.

Freddo et al. (2009) avaliaram os efeitos da LLLT, utilizando *laser* vermelho (AlGaInP,  $\lambda=685\text{nm}$ ,  $P=35\text{mW}$ ,  $DE=10\text{J}/\text{cm}^2$ ) e infravermelho (GaAlAs,  $\lambda=830\text{nm}$ ,  $P=50\text{mW}$ ,  $DE=10\text{J}/\text{cm}^2$ ), em fêmures de ratos Wistar, após implantação de placas reabsorvíveis, observando as respostas inflamatórias e o reparo tecidual. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo controle, sem *laser*; um grupo com *laser* vermelho e um terceiro grupo com *laser* infravermelho. Os autores concluíram que nos estágios iniciais até 7 dias, ambos os *lasers* tiveram efeito biomodulador positivo, com estímulo à vascularização, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, ou seja, tiveram um padrão histológico melhor que o grupo controle. Com 21 dias, o grupo vermelho apresentou tecido de granulação aumentado quando comparado com os outros grupos, sugerindo retardo no processo cicatricial.

A LLLT foi avaliada na regeneração de defeitos ósseos decorrentes da doença periodontal em um estudo de boca dividida. Aboelsaad et al. (2009) avaliaram 20 pacientes que apresentavam periodontite crônica, com perda de suporte de moderada à avançada e com defeitos ósseos bilaterais os quais foram preenchidos com um biomaterial (vidro bioativo). Um lado foi exposto a laserterapia (AlGaAs,  $\lambda=830\text{nm}$ ,  $P=40\text{mW}$ ,  $DE=4\text{J}/\text{cm}^2$ ) enquanto o outro lado serviu como controle, não recebendo LLLT. Após 3 e 6 meses, foi observada uma redução da profundidade à sondagem e também uma redução do defeito ósseo, estatisticamente significativas no lado irradiado, quando comparados com o controle. Os autores concluíram que a LLLT foi eficiente na fase inicial do reparo, onde acelerou a regeneração óssea.

Al Ghamdi, Kumar e Moussa (2012), realizaram uma revisão sistemática sobre o uso da LLLT no aumento da proliferação de diferentes linhagens celulares, sem comprometer as características naturais das células. A revisão incluiu estudos entre os anos de 1923 e 2010 e avaliou inúmeros pontos, dentre eles: os mecanismos

de proliferação celular induzidos pela LLLT; os efeitos biológicos da LLLT; os mecanismos de ação da LLLT e os efeitos contrários à proliferação celular da LLLT. Os autores observaram que o comprimento de onda infravermelho apresentava efeitos positivos e negativos em cultura de células de fibroblastos. A análise sugeriu também, que a densidade de energia entre  $0,5\text{J}/\text{cm}^2$  a  $4\text{J}/\text{cm}^2$  são úteis na proliferação celular de várias linhagens de células. Além disso, a LLLT é capaz de aumentar a energia na forma de ATP no interior da célula, a síntese e produção de colágeno, além de iniciar mitoses e conversão de ATP no interior da célula, aumentando as funções celulares e a taxa de proliferação.

Na avaliação realizada por Weber et al. (2014), o efeito sistêmico da LLLT na função da glândula tireóide foi avaliado, bem como, a regulação do cálcio, através dos níveis de T3 e T4, após colocação de implante dentário em coelhos. Quarenta machos foram distribuídos em cinco grupos, sendo dois deles grupos controles e três grupos irradiados com doses de 5, 10 e 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  utilizando um *laser* de GaAIs, aplicado em 7 sessões. Todos os grupos foram submetidos à extração de incisivo inferior esquerdo, seguido da instalação de um implante osseointegrado. Os autores concluíram que a utilização da LLLT em diferentes doses, foi capaz de provocar alterações sistêmicas nos níveis de hormônios da tireóide.

No estudo de Aras et al. (2015), foram avaliados os efeitos da LLLT na regeneração óssea na sutura mediana após a expansão de maxila. Foram utilizados 32 ratos Wistar, divididos em dois grupos irradiados (LG1 e LG2) e dois grupos controles (CG1 e CG2). A irradiação foi realizada com *laser* de GaAIs, com comprimento de onda de 808nm e densidade de energia de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , diariamente, durante 4 dias, iniciando a LLLT 4 dias após a expansão cirúrgica. Os autores concluíram, após análise histológica que o grupo *laser* apresentou um número

significativamente maior de osteoblastos do que o grupo controle; e que este apresentou um número significativamente maior de osteoclastos do que os grupos LG1 e LG2. Os pesquisadores concluíram então, que a LLLT associada à expansão rápida de maxila, influencia a regeneração óssea em suturas, acelerando a cicatrização.

#### 2.4 Zebrafish

Diferentes modelos animais vêm sendo adaptados para estudos que possam, ao mesmo tempo, acelerar e otimizar análises, diminuir custos e preservar uma complexidade de sistemas que permita a extrapolação dos achados para outros animais e também para humanos (LIESCHKE e CURRIE, 2007; XI et al., 2013).

O teleósteo *Danio rerio*, mundialmente conhecido como *Zebrafish*, é um pequeno teleósteo da família *Cyprinidae*, de aproximadamente 3-4 cm de comprimento, de água doce, que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas. Além disso, os genes deste teleósteo são evolutivamente conservados e apresentam um alto grau de similaridade com os genes de humanos e de camundongo (LIESCHKE e CURRIE, 2007).

O teleósteo *Danio rerio*, proposto primeiramente como animal modelo para estudos sobre mecanismos genéticos do desenvolvimento por George Streisinger (1983), vem sendo utilizado de maneira progressivamente mais intensa em áreas que já não mais se restringem ao desenvolvimento, e incluem análises toxicológicas, neurofisiológicas e biomédicas (SPENCE et al., 2008), graças a seu rápido desenvolvimento externo e embriões transparentes, permitindo simultaneamente o uso de

Na América Latina, em especial, as vantagens em relação aos custos de manutenção, somadas às novas tecnologias desenvolvidas para este modelo animal têm sido atrativas, e seu uso tem sido ampliado acompanhando o fenômeno mundial

*Conclusão*

---



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada durante o desenvolvimento inicial do *Zebrafish*, levando em consideração os parâmetros de laserterapia estipulados para os lasers vermelho e infravermelho, pode-se concluir que:

- I. A LLLT resultou em retardo na eclosão e redução da capacidade de resposta cognitiva dos animais.
- II. A LLLT provocou maior mortalidade no animais, comparado ao grupo controle.
- III. Apesar de pequeno número, a LLLT provocou alterações teratogênicas, observadas pelas anormalidades cardíacas, oculares e caudais dos animais.
- IV. A LLLT resultou no aumento do número de batimentos cardíacos, de forma dose-dependente.
- V. A LLLT provocou alterações no comportamento exploratório, aumentando o deslocamento e a velocidade média dos animais.
- VI. A LLLT não alterou qualitativamente a formação cartilaginosa e óssea inicial do *Zebrafish*.



*Anexos*



## 9 ANEXOS

### 9.1 ANEXO A - Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6212

Porto Alegre, 14 de janeiro de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "EFEITOS EMBRIOTÓXICOS E TERATOGÊNICOS DA LLLT: ESTUDO EM ZEBRAFISH" coordenado por JOAO BATISTA BLESSMANN WEBER. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

## 9.2 ANEXO B - Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA-PUCRS)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 03/2015 - CEUA

Porto Alegre, 22 de janeiro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00434, intitulado "Efeitos embriotóxicos e teratogênicos da LLLT: Estudo em Zebrafish".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
2.304	Danio rerio	03/2015 – 12/2015

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Membro Titular da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. João Batista B. Weber  
FO  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: ceua@pucrs.br