

Estudo dose-resposta da atuação do laser de baixa potência sobre processo inflamatório induzido por carragenina em *Zebrafish*

Kelly Christine Ferreira Folhadella¹, Ives Charlie da Silva², Anderson Zanardi de Freitas³, Aginaldo Silva Garcez⁴, Silvia Cristina Nunez¹

¹ *Universidade Brasil, Instituto Científico e Tecnológico, Bioengenharia, São Paulo, SP*

² *Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP*

³ *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo, Brasil*

⁴ *Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, Brasil*

kfolhadella@gmail.com*

Resumo: Este estudo foi pensado para desenvolver uma alternativa de pesquisa mais acessível para que formas não farmacológicas de tratamento, como é o caso da fotobiomodulação, possam ser mais bem compreendidas e aprimoradas. Aqui, o *zebrafish* foi utilizado como modelo experimental para tratamento pela fotobiomodulação da inflamação induzida por carragenina. O tratamento da inflamação induzida foi feito com laser 660nm e a análise dos resultados realizada através de processamento histológico e OCT (*Optical Coherence Tomography*). A análise qualitativa dos resultados mostrou que o *zebrafish* representa um bom modelo alternativo e menos oneroso para o estudo da ação da fotobiomodulação sobre processos inflamatórios.

Palavras-chave: *Zebrafish*, inflamação, fotobiomodulação

Introdução

A Fotobiomodulação (FBM) é uma modalidade terapêutica que apresenta ampla gama de aplicações clínicas e seus mecanismos de atuação na inflamação ainda são objeto de investigação em diferentes tipos de modelos experimentais. O *zebrafish*, também conhecido como paulistinha, é um modelo animal amplamente utilizado pela indústria farmacêutica e as condições necessárias ao seu manejo adequado, assim como sua manutenção, e a facilitação da sua reprodução e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos ³ Seu genoma foi sequenciado e quando comparado com o genoma humano, aproximadamente 70% dos genes têm um ortólogo do *zebrafish*. Além disso, quando analisamos apenas os genes ligados a doenças essa similaridade sobe para 82% ². Sabendo que o *zebrafish* é um modelo já bem estabelecido mundialmente como uma boa alternativa para diversos tipos de pesquisa científica, o presente estudo tem por objetivo estabelecerlo como um modelo bastante viável no estudo da inflamação e da terapia com laser de baixa potência, pela sua facilidade de manejo e pelo baixo custo associados à relevância biológica deste organismo.

Material e Métodos

Após aprovação pelo Comitê de Ética Uso Animais (336/2017) os animais foram divididos em grupos: G1-sem intervenção, G2- Injeção de solução salina na cavidade celomática, G3- injeção de 3,5% de solução de carragenina na cavidade celomática, G4, G5 e G6 injeção de 3,5% de solução de carragenina na cavidade peritoneal e fotobiomodulação com laser de baixa potência (660 nm, 100 mW, 3 J, 4 J e 20 J) (Tabela 1). Imagens de tomografia por coerência óptica (OCT), como mostram as Figuras 1 e 3, e histologia foram realizados em vários momentos, como na Figura 2, para análise dos efeitos.

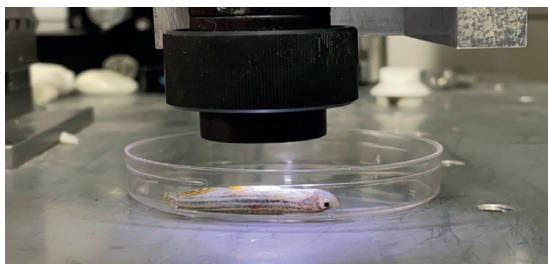
Tabela 1- Grupos experimentais

Grupos	Amostra	Procedimento
G1	3	Sem intervenção
G2	3	Solução salina
G3	3	Carragenina 3,5%
G4	3	Carragenina 3,5% + 3 J
G5	3	Carragenina 3,5% + 4 J
G6	3	Carragenina 3,5%+ 20 J

Os 18 peixes foram divididos aleatoriamente em seis aquários com 0,25 L de água para estabelecer os tratamentos supracitados. Um grupo não recebeu nenhum tratamento e foi apenas acompanhado durante o período experimental tendo suas medidas tomadas em todos os tempos experimentais. Os animais do grupo G2 receberam injeção de 10µl de solução PBS (*Phosphate Buffered Saline* ou tampão fosfato salino) na cavidade peritoneal.

O grupo controle carragenina, G3, recebeu injeção de 10 µl de solução de carragenina da Sigma-Aldrich, USA a 3,5% na cavidade peritoneal, com seringa de 1ml e agulha de 6 mm x 0,23 mm. Os grupos G4, G5 e G6, duas horas após a injeção, foram irradiados na região abdominal com laser portátil Recover- MMOptics com potência de 100 mW e comprimento de onda de 660 nm.

Figura 1: Peixe posicionado no OCT. Fonte: Arquivo pessoal



OCT INICIAL (Controle sadio - Naive)
CONTROLE PBS, CONTROLE CARRAGENINA E GRUPOS EXPERIMENTAIS (Injeção)
(Duas Horas depois da injeção) IRRADIAÇÃO NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS
(Duas Horas depois da irradiação) OCT FINAL – GRUPOS EXPERIMENTAIS

Figura 2: Tempos experimentais. Fonte: Arquivo pessoal

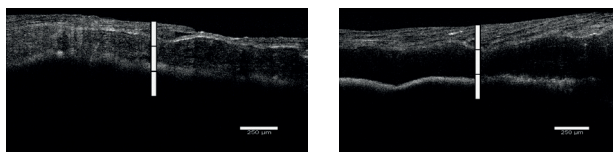
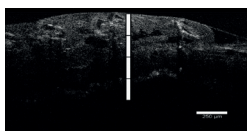


Figura 3: Imagens do OCT dos grupos G1, G2 e G3. Fonte: arquivo pessoal



Agradecimentos: Agradecemos à empresa MMOptics, de São Carlos pela parceria e ao CREFITO-3, pela concessão de bolsa de estudo, e a Universidade Brasil.

Resultados e Discussão

O *zebrafish* já é um modelo bem conhecido mundialmente, principalmente para estudos genéticos e farmacológicos ^{1,4}. Entretanto, o presente estudo pretende demonstrar que ele é igualmente viável para estudo da fotobiomodulação em inflamação, como é possível observar em seus achados. Os resultados do OCT vão ao encontro do que se vê na histologia, no que se refere à análise

qualitativa dos resultados. Fica claro que o organismo do *zebrafish* responde bem ao estímulo da luz no comprimento de onda do vermelho (660nm) quando sofre processo inflamatório induzido por carragenina, pois todos os grupos experimentais mostraram resposta positiva, no sentido de uma tentativa de retorno a um padrão de homeostasia. O grupo que mostrou melhor resultado com relação a harmonia do tecido e tendência a uma reorganização próxima ao padrão anatômico normal de um *Zebrafish* adulto foi o do grupo 20 J, entretanto, os grupos 3 e 4 J também exibem uma tendência à reorganização tecidual.

Conclusão

Tomando por base todo conhecimento que já está disponível na literatura sobre o modelo *Zebrafish*, e ainda, tendo em vista os resultados deste estudo, pode-se concluir que o *Zebrafish* representa uma ótima alternativa como modelo experimental no estudo da PBM sobre a inflamação.

Referências

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 94, n. 1, p. 75–80, 2009.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

WESTERFIELD, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition. [s.l: s.n.].

ZANG, L.; SHIMADA, Y.; NISHIMURA, N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.