



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Impacto da irradiação de luz vermelha em embriões de *Danio rerio*
(zebrafish) expostos à radiação gama**

KARINE RODRIGUES DOS ANJOS GUSMÃO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

São Paulo

2024

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Impacto da irradiação de luz vermelha em embriões de *Danio rerio*
(zebrafish) expostos à radiação gama

KARINE RODRIGUES DOS ANJOS GUSMÃO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

São Paulo

2024

Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar: RODRIGUES DOS ANJOS GUSMÃO, K. ***Impacto da irradiação de luz vermelha em embriões de Danio rerio (zebrafish) expostos à radiação gama***. 2024. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues dos Anjos Gusmão, Karine
Impacto da irradiação de luz vermelha em embriões de Danio rerio (zebrafish) expostos à radiação gama / Karine Rodrigues dos Anjos Gusmão; orientador Anderson Zanardi de Freitas. -- São Paulo, 2024.
91 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2024.

1. Irradiação de luz vermelha . 2. Zebrafish. 3. Micronúcleos. 4. Radiação ionizante. I. Zanardi de Freitas, Anderson , orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus por ser a base de tudo em minha vida.

Ao meu marido por todo apoio e incentivo.

Aos meus pais e irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu sustento nos dias mais fáceis e difíceis, nas noites e dias, nas semanas e nos anos em que estive realizando um dos meus sonhos.

Ao meu marido Fabrício, que sempre esteve comigo, segurando em minhas mãos, me apoiando, ajudando, dando todo auxílio nestes dias que não foram tão simples.

Aos meus pais Marcos e Gisele, por sempre terem feito de tudo para que o estudo em minha vida fosse em primeiro lugar. Certamente se não fosse por eles, eu não estaria escrevendo este agradecimento.

À minha irmã Caroline, por estar presente, me ajudar, me apoiar e por ter me incentivado a iniciar a graduação em outra cidade me fazendo sair da zona de conforto.

Ao meu cunhado Sergio, por toda ajuda e por ter me recebido junto a minha irmã em sua casa para que eu pudesse iniciar a pós-graduação.

Aos meus familiares e amigos que cada um de sua maneira ajudou e se alegrou junto a mim.

Ao meu orientador Dr. Anderson Zanardi de Freitas, que depositou sua confiança em mim, acreditando que eu seria capaz de trilhar este caminho. Obrigada por toda a ajuda, orientação, ensinamentos e atenção.

Ao Dr. José Roberto Rogero pela oportunidade de desenvolver parte da pesquisa no laboratório de Ecotoxicologia. Obrigada por todos os ensinamentos, todas as conversas, paciência e acolhimento.

À Ms. Sizue Ota Rogero, pelo carinho, incentivo e atenção durante estes anos.

Ao Dr. Daniel Perez Vieira, por todos os ensinamentos, por todo o acolhimento no Centro de Biotecnologia (CEBIO) e principalmente por toda a paciência e excelência.

À Dra. Martha Simões Ribeiro, por toda ajuda, críticas construtivas, apoio e por ceder a LEDbox de seu laboratório para que esta pesquisa fosse realizada.

À Dra. Adriana Kuchinski Cavalcante, por todos os ensinamentos, ajuda, apoio e paciência desde o início desta trajetória, me mostrando cada detalhe do mundo da toxicologia, muito obrigada.

À Elisabeth Somessari e Vladimir, do Centro de Tecnologia das Radiações (CETER), por estarem sempre disponíveis em me atender e auxiliar nas irradiações e por todas as conversas e histórias.

Ao Dr. Raúl Bonne Hernández da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por ter me recebido em seu laboratório e pela doação de embriões de zebrafish.

À Esther Miranda, por toda a ajuda, amizade, companhia, risadas apoio e carinho ao longo desses anos.

Ao Dr. Murilo Vigilato, pela ajuda nas estatísticas, pelos ensinamentos e pela parceria.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em especial ao Centro de Lasers e Aplicações (CELAP), ao Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA) e ao Centro de Tecnologia das Radiações (CETER) pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Universidade de São Paulo pelo Programa de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste projeto e sonho, o meu muito obrigada.

Ora, a fé é a confiança daquilo que esperamos e a certeza das coisas
que não vemos.

Hebreus 11:1 NVI

RESUMO

ANJOS, K.R.G. ***Impacto da irradiação de luz vermelha em embriões de Danio rerio (zebrafish) expostos à radiação gama.*** 2024. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP. São Paulo.

A radiação ionizante (RI), que é utilizada no tratamento de pacientes oncológicos, na radioterapia (RT), pode ocasionar múltiplos danos nas células saudáveis, em seus componentes e estruturas moleculares, o que vai depender do tipo de célula irradiada e da dose utilizada. Uma das consequências destes danos nas células é a ocorrência de mucosite e radiodermite, que são efeitos adversos da RT. Assim, torna-se imprescindível a busca por novos radioprotetores. Laser e diodo emissor de luz (LED), por sua vez, vêm sendo utilizados para o alívio destes efeitos dos efeitos colaterais da RT. No entanto, é conhecido que este tipo de radiação também promove a formação de espécies reativas de oxigênio, como a RT, dependendo da dose de luz. Nesse contexto, o presente trabalho foi realizado para entender a influência da irradiação com LED's frente à radiação ionizante. Foi utilizado embriões de zebrafish para análise *in vivo* deste teste. A utilização de embriões de zebrafish permite a exposição dos organismos em microplacas de cultura celular, em diversas condições experimentais, o que facilita a utilização de várias réplicas de uma só vez, além de acompanhar a resposta de formação no desenvolvimento embriolar, sendo este um modelo animal que apresenta 70% de semelhança genética com humanos. Para a realização do ensaio, foi utilizado o LED vermelho de 660 nm nos tempos de 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos. Para o ensaio utilizando a radiação ionizante, foram utilizadas as doses de 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy e 25 Gy para organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização e as doses de 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy e 50 Gy para organismos com 24 horas pós-fertilização. Os organismos foram observados durante 144 horas de ensaio. Para análise do embrião, além do ensaio com a luz vermelha e a utilização da radiação gama, foi realizado teste de micronúcleos que são indicadores aceitos para evidenciar como estão as células de um organismo vivo e como consequência sua saúde, pois é um dano genotóxico irreversível para a célula. Os resultados obtidos demonstraram que quanto maior a dose de radiação gama, maior foi a taxa de mortalidade dos organismos, e também ao utilizar o LED antes da exposição dos organismos da radiação gama, houve uma diminuição da mortalidade. A frequência de MN em organismos irradiados com radiação gama mostraram-se muito maiores que os valores obtidos em organismos irradiados apenas com o LED ou com LED associado à radiação gama. E os organismos que receberam LED e radiação gama posteriormente, foram os grupos que tiveram menor frequência de micronúcleos, sugerindo o provável efeito radioprotetor do LED.

Palavras-chave: *Danio rerio*, Radiação ionizante, Diodo emissor de luz.

ABSTRACT

ANJOS, K.R.G. ***Impact of red light irradiation on *Danio rerio* (zebrafish) embryos exposed to gamma radiation. 2023.*** Xxp. Dissertation (Master's Degree in Nuclear Technology), Nuclear and Energy Research Institute - IPEN - CNEN/SP. São Paulo.

Ionizing radiation (IR), which is used in the treatment of cancer patients, in radiotherapy (RT), can cause multiple damages to healthy cells, their components and molecular structures, which will depend on the type of cell irradiated and the dose used. One of the consequences of this cell damage is the occurrence of mucositis and radiodermatitis, which are adverse effects of RT. Therefore, the search for new radioprotectors becomes essential. Laser and light-emitting diode (LED), in turn, have been used to alleviate these side effects of RT. However, it is known that this type of radiation also promotes the formation of reactive oxygen species, such as RT, depending on the light dose. In this context, the present work was carried out to understand the influence of LED irradiation compared to ionizing radiation. Zebrafish embryos were used for in vivo analysis of this test. The use of zebrafish embryos allows the exposure of organisms in cell culture microplates, in different experimental conditions, which facilitates the use of several replicas at once, in addition to monitoring the formation response in embryolarval development, this being a model animal that has 70% genetic similarity to humans. To carry out the test, a 660 nm red LED was used at times of 1 minute, 6 minutes and 12 minutes. For the test using ionizing radiation, doses of 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy and 25 Gy were used for organisms 4 and 6 hours post-fertilization and doses of 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy and 50 Gy for organisms 24 hours post-fertilization. The organisms were observed during 144 hours of testing. Keywords: *Danio rerio*, Ionizing radiation, Light-emitting diode. To analyze the embryo, in addition to the red light test and the use of gamma radiation, a micronucleus test was carried out, which are accepted indicators to demonstrate how the cells of a living organism are doing and, as a consequence, their health, as it is irreversible genotoxic damage. to the cell. The results obtained demonstrated that the higher the dose of gamma radiation, the higher the mortality rate of the organisms, and also when using the LED before exposing the organisms to gamma radiation, there was a decrease in mortality. The frequency of MN in organisms irradiated with gamma radiation was much higher than the values obtained in organisms irradiated only with LED or with LED associated with gamma radiation. And the organisms that subsequently received LED and gamma radiation were the groups that had a lower frequency of micronuclei, suggesting the probable radioprotective effect of LED.

Keywords: *Danio rerio*, Ionizing radiation, Light-emitting diode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda.....	28
Figura 2 – Espectro de absorção dos cromóforos da pele.....	29
Figura 3 – Peixe <i>Danio rerio</i> adulto.....	30
Figura 4 - Comparação de vantagens entre modelos animais para uso de análise de toxicidade.....	32
Figura 5 - Processo de desenvolvimento embrionário do zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adaptado de Kimmel et al. (1995). Embriogênese em 72 horas pós-fertilização (hpf): (1) o zigoto, (2) clivagem, (3) blástula, (4) gástrula, (5) segmentação, (6) faríngula, (7) e os períodos de incubação (eclosão).....	33
Figura 6 – Filtro com bomba do aquário.....	38
Figura 7 – Aquário de reprodução utilizado nos ensaios com zebrafish.....	39
Figura 8 – Preparo da solução para o meio embriônico.....	40
Figura 9 – Equipamento emissor de LED 660 nm (LEDbox).....	41
Figura 10 – Irradiador de radiação gama tipo Gammaecell.....	42
Figura 11 – Centrífuga utilizada para realizar o processo de dissociação dos embriões.....	44
Figura 12 – Tubos de 50 ml com os filtros (cell strainer).....	44
Figura 13 – Equipamento citômetro de fluxo utilizado para leitura dos MN.....	45
Figura 14 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 4 hpf.....	46
Figura 15 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 6 hpf.....	47
Figura 16 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 24 hpf.....	47

Figura 17 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 1 minuto em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.....	48
Figura 18 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 6 minutos em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.....	49
Figura 19 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 12 minutos em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.....	49
Figura 20 - (A) Larva de <i>Danio rerio</i> exposto em 4hpf à 12 min de LED com edema no pericárdio e alteração no saco vitelínico; (B) Larva de <i>Danio rerio</i> exposto em 6hpf à 6 min de LED com edema no pericárdio.....	50
Figura 21 - Letalidade por dose de radiação gama (10% DL ₅₀), nos ensaios 1, 2 e 3 respectivamente com 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf.....	51
Figura 22 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 96 horas de ensaio.....	52
Figura 23 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 120 horas de ensaio.....	52
Figura 24 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 144 horas de ensaio.....	53
Figura 25 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 24 horas pós-fertilização em 96 horas, 120 horas e 144 horas de ensaio.....	54
Figura 26 - Valores da média dos 3 ensaios para obter a DL ₅₀ nos organismos irradiados com radiação gama em 4hpf, 6hpf e 24 hpf.....	55
Figura 27 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 1 minuto e a 10% de DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	56
Figura 28 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 6 minutos e a 10% de DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	57
Figura 29 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 12 minutos e a 10% de DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	58
Figura 30 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 4 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	59
Figura 31 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 6 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	60

Figura 32 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 24 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	61
Figura 33 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 1 minuto e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	62
Figura 34 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 6 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	63
Figura 35 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	64
Figura 36 - Valores do número de anomalias de organismos expostos com 4 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	65
Figura 37 - Valores do número de anomalias de organismos expostos com 6 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	66
Figura 38 - Valores do número de anomalias de organismos com 24 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama.....	67
Figura 39 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 1 minuto e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	68
Figura 40 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 6 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	69
Figura 41 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 12 minutos e a DL ₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.....	70
Figura 42 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 4 hpf.....	71
Figura 43 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 6 hpf.....	72

Figura 44 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 24 hpf.....72

Figura 45 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (0) em escala logarítmica, levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos, DL₅₀ e colchicina, de todos os tempos pós-fertilização.....73

Figura 46 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 4 hpf.....74

Figura 47 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 6 hpf.....75

Figura 48 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 24 hpf.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LED – Diodo Emissor de Luz

LASER – Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação

DL₅₀ – Dose Letal Mediana

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

O₂ – Oxigênio

GaAs – Arseneto de Gálio

ROS – Espécies reativas de Oxigênio

PDT – Terapia Fotodinâmica

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

O²⁻ – Superóxido

Ca²⁺ – Íons de Cálcio

OH⁻ – Hidroxila

FET- Test – Fish Embryo Toxicity

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

MN – Micronúcleo

MNs – Micronúcleos

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEQMA – Centro de Química e Meio Ambiente

NaCl – Cloreto de Sódio

KCl – Cloreto de Potássio

CaCl₂·2H₂O – Cloreto de Cálcio Dihidratado

MgSO₄·7H₂O – Sulfato De Magnésio Heptahidratado

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de Cálcio Dihidratado

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato De Magnésio Heptahidratado

hpf – Horas pós-fertilização

Gy – Gray

CETER – Centro de Tecnologia das Radiações

CEBIO -

PBS – Phosphate-buffered saline

EMA+ – Viabilidade Celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Câncer	22
3.2 Radiação ionizante	22
3.3 Efeitos biológicos da radiação	23
3.4 Radiomodificadores	24
3.4.1 Radiossensibilizadores	25
3.4.2 Radioprotetor	25
3.5 Histórico LED	26
3.5.1 Interação do LED e laser com o tecido biológico	27
3.6 <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	29
3.6.1 Genética do zebrafish	31
3.6.2 Fish Embryo Toxicity (FET – Test)	32
3.7 Estudos toxicológicos	34
3.7.1 Biomarcadores genéticos	34
3.7.2 Micronúcleos	35
3.7.3 Testes genotóxicos	35
3.7.4 Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Aprovação no Comitê de Ética	37
4.2 Criação e Manutenção do Modelo Experimental	37
4.3 Reprodução zebrafish	39
4.4 Ensaio com a utilização do LED	40
4.5 Dose letal mediana da radiação gama	41
4.6 Ensaio associando o LED com radiação gama	43
4.7 Citometria de fluxo para quantificação de micronúcleos	43
4.7.1 Dissociação de organismos de <i>Danio rerio</i> na fase larval	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) em embriões de <i>Danio rerio</i>	46
5.2 Toxicidade de 10% da DL₅₀ da radiação gama em embriões de <i>Danio rerio</i>	50

5.3 Toxicidade da radiação gama em embriões de <i>Danio rerio</i> para obtenção da DL₅₀	51
5.4 Valores da DL₅₀ obtida com radiação gama	55
5.5 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) associado à 10% da DL₅₀ de radiação ionizante em embriões de <i>Danio rerio</i>	56
5.6 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) associado à DL₅₀ de radiação ionizante em embriões de <i>Danio rerio</i>	59
5.7 Valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED	71
5.8 Comparação dos valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED, DL₅₀ de radiação gama e colchicina	73
5.9 Valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED e DL₅₀ da radiação gama	74
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o INCA, é estimado que nos anos de 2023, 2024 e 2025 ocorram 704 mil novos casos de câncer no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2022). Com a consequência do aumento de novos casos de câncer, há também a necessidade e aumento de tratamentos quimioterápicos e radioterápicos e com esta tendência, há a necessidade da utilização de agentes radiomodificadores. (SOUZA et al., 2000).

A radioterapia é amplamente utilizada em variados tipos de câncer, porém, com o tratamento radioterápico há efeitos colaterais. Grandes doses de radiação ionizante, podem levar a má qualidade de vida de pacientes oncológicos, interferência no tratamento do câncer e até no aumento das chances de óbito. (FUSISSAKI et al., 2019; HAMA e TATE, 2019). Com este fato, é importante e necessário novas pesquisas para descoberta de radiomodificadores que possam amenizar os efeitos colaterais da radioterapia, como mucosite e radiodermite. Artigos mostram que a terapia com luz de baixa potência pode ser utilizada como agente radiomodificadora de efeitos da radioterapia, ou seja, da radiação ionizante (CHERKASOVA et al., 2020). Diodo emissor de luz (LED) e LASER (Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), são utilizados para terapia com luz de baixa potência com comprimento de onda entre vermelho e infravermelho, pois estes penetram mais profundo no tecido biológico. (SABINO et al., 2016).

No ambiente clínico são utilizados LASER no qual possui luz monocromática, colimada em que as ondas emitidas são paralelas possuindo a mesma distância e coerente em que a luz incide paralelamente aos seus feixes. E também, na clínica diária, é utilizado o LED, que também é monocromático, coerente, mas não é colimado, porém o efeito é bastante parecido com o LASER, pois quando a luz é incidida no tecido biológico, o efeito é semelhante (HEISKANEN et al., 2018).

Ao utilizar a luz de baixa potência para terapias, há a formação de espécies reativas de oxigênio, em que surgem da instabilidade dos elétrons desemparelhados, fazendo com que tenha uma alta reatividade com moléculas biológicas, aumentando a atividade celular. Então, a associação da luz junto com a radiação ionizante, pode

haver a proteção ou sensibilização do tecido celular, e isto vai depender da dose de luz utilizada. (CHUNG et al.,2012).

Os estudos pré-clínicos são extremamente essenciais para que posteriormente os estudos clínicos sejam realizados e se obtenha avanço de novos tratamentos e tecnologias e o zebrafish (*Danio rerio*) vem sendo utilizado como modelo pré-clínico em estudos envolvendo fármacos, ecotoxicologia, neurologia e outras áreas (CARTNER et al., 2019). O zebrafish é um peixe tropical de água doce, teleósteo, que atinge o tamanho de até 4 cm em sua fase adulta. É um peixe que possui o genoma parecido com o dos humanos, além do reparo de DNA (SCHNEIDER et al., 2009). O zebrafish possui uma reprodução bastante rápida e em 48 horas de vida a 72 horas, o embrião passa para o estado larval, sendo possível observar seu desenvolvimento e seus órgãos, pois o embrião é transparente assim como a larva. Em um estudo mais recente, foi evidenciado que os embriões e larvas de zebrafish que foram expostos à radiação gama, demonstraram ser sensíveis à radiação ionizante, desenvolvendo alterações importantes no seu desenvolvimento e também aumentando a chance de danos (DAMASCENO, 2019).

Uma das vantagens de se utilizar o zebrafish como modelo animal em pesquisas é a possibilidade de ter vários ovos em um único ensaio, tendo várias réplicas e também diferentes condições para análise dos testes, possibilitando a realização em curto tempo. Outro fato importante é que a utilização do zebrafish coloca em prática o princípio dos 3 R's que é reduzir, refinar e substituir os mamíferos bastante utilizados em pesquisa, além de seu custo ser bem menor, sua reprodução mais rápida quando comparado com a utilização de roedores, por exemplo, e o fato do tempo de pesquisa ser menor, conseqüentemente (DAMMSKI et al., 2011).

Tem crescido o número de estudos que usam o zebrafish para avaliar alterações morfológicas com uso de substâncias como drogas e álcool, além da análise comportamental que estes estudos proporcionam, podendo fazer comparações com o padrão humano, O fato de o embrião ser transparente também se torna a grande vantagem para análise de alterações morfológicas quando são expostos à diferentes substâncias (DAMMSKI et al., 2011).

Assim, é importante que a busca por agentes radiomodificadores com a utilização deste modelo animal, como foi proposto no presente estudo, seja realizada

para descoberta de novos tratamentos, tecnologias e aprofundamento de conhecimento.

2 OBJETIVO

O objetivo deste projeto é investigar o papel radiomodificador da radiação LED de emissão vermelha em embriões de *Danio rerio* expostos à radiação gama.

Objetivos específicos:

- Obter a DL₅₀ (dose letal mediana) da radiação gama em embriões de *Danio rerio*;
- Determinar a influência da irradiação com LED em embriões de *Danio rerio* expostos à radiação gama;
- Determinar a frequência de micronúcleos em embriões de *Danio rerio* irradiados com LED e radiação gama.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer é uma das doenças mais recorrentes em todo o mundo, sendo um dos mais recorrentes motivos de morte, é, portanto, um grande causador de baixa da expectativa em todos os países. Em praticamente todos os países ao redor do mundo, esta doença é a causa primária ou secundária de morte antes dos 70 anos. As consequências de novos casos ao passar dos anos e da mortalidade do câncer está crescendo aceleradamente em todo o mundo (SUNG et. al., 2021).

Para o Brasil, estima-se que nos anos de 2023 a 2025 acontecerão 704 mil casos novos de câncer e estima-se que o número de casos novos de câncer da cavidade oral é de 15.100 casos, no Brasil, nos anos de 2023 a 2025, no qual 4.200 dos casos ocorrerá no sexo feminino e 10.900 dos casos, acometerá o sexo masculino. (MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA, 2022.)

3.2 Radiação ionizante

A radiação ionizante é resumida como uma energia suficiente para liberar elétrons de um átomo, fazendo com que este átomo fique carregado; na radiação não ionizante como, por exemplo, luz visível, ondas de rádio ou radiação ultravioleta, não há energia suficiente para tirar os elétrons. Há duas formas de ionização: a direta e a indireta. Na ionização direta, há a interação entre cargas elétricas, como no caso das radiações alfa e beta. Já no caso da ionização indireta, não há interação entre cargas elétricas, iguais ocorre na radiação gama, nos raios X e também na emissão de nêutrons (SPINELLI, 2006).

Na radiação gama (γ) há a formação de ondas eletromagnéticas emitidas por núcleos instáveis e adianta há a emissão de uma partícula alfa ou beta (α ou β). Então, após o decaimento, o radionuclídeo-filho, recém formado, ainda permanece com energia em excesso. Para dissipar esta energia, há emissão de raios gama. (SPINELLI, 2006).

3.3 Efeitos biológicos da radiação

Quando há exposição à radiação, muitos fatores devem ser levados em consideração: dose e tempo, forma de exposição e condição biológica. Abaixo, estão explicados os fatores mais relevantes que são considerados quando se quer analisar o potencial de interação com a matéria biológica (OKUNO, 2007).

Dose de radiação em relação ao tempo: quanto maior for a dose de radiação, maior será o efeito dela. No entanto, isto é modificado quando há o fracionamento desta dose. A dose pode ser elevada se for em uma única exposição, porém, pode ser irrelevante se esta mesma dose for fracionada ao longo do tempo (OKUNO, 2007).

Em relação à forma de exposição: uma dose pode ter o efeito distinto se for originada de uma partícula ou de fótons. As partículas possuem um baixo poder de penetração, e a proteção deste tipo é mais simples, ao contrário da exposição com fótons. A forma de resposta de um radiofármaco é diferente se for injetado na circulação tendo como objetivo produzir uma imagem ou ser captado por variados tipos de células cancerígenas (TAUHATA et al., 2014).

Algumas condições biológicas favorecem o dano causado pela radiação, enquanto outras acabam limitando este dano. Um grande exemplo são os estágios iniciais de desenvolvimento do embrião, que são os mais sensíveis à radiação. Já nos tecidos de um adulto, células epiteliais que possuem divisão rápida, como é o caso do intestino delgado, são muito mais sensíveis à radiação do que as células do tecido muscular. Outro fator a ser levado em consideração é um ser humano que possui altos níveis de estresse ambiental, como: desnutrição, estresse, reprodução, doença, este, provavelmente será mais vulnerável quando comparado ao indivíduo sadio. (DAFRE, 2013).

A radiação pode atuar em diversos níveis, como: componentes das células, células, tecidos, organismos e até populações inteiras. As lesões produzidas no DNA (ácido desoxirribonucleico) são as que mais causam consequências, porém estas lesões podem ocorrer também em fosfolípidos de membrana ou proteínas, além de outros componentes. (DAFRE, 2013).

Quando há produção de lesões no DNA, esse é considerado um efeito direto. A lesão é uma alteração na estrutura do DNA. O DNA de um cromossomo pode ser quebrado em duas partes (quebra dupla na fita do DNA) ou pode ser uma quebra simples, quando uma das fitas do DNA é rompida. Há também, a possibilidade de ter ligação entre duas fitas de DNA, o que é conhecido como “crosslink”, quando um agente intercalante, ou seja, sensibilizador estiver presente. Quando ocorre este caso, as fitas não podem mais se separar e a célula acaba perdendo a capacidade de fazer a divisão, tendo como consequência até a morte celular, devido a esta lesão. As bases que são componentes do DNA podem ser retiradas ou ser alteradas quimicamente para diversos derivados. Em quebras duplas no DNA há maior complicação no reparo e podem gerar cromossomos anormais até a perda de partes de cromossomos. (DAFRE, 2013).

No efeito indireto da radiação, ocorre a produção de substâncias que são lesivas, como, por exemplo, os radicais livres. Estes, arrancam elétrons de moléculas importantes para o funcionamento celular: DNA, proteínas, lipídeos de membrana. Os antioxidantes levam a diminuição nos danos causados pela radiação de efeito indireto, pois estes, na maioria das vezes envolvem a ação de radicais livres. (DAFRE, 2013).

3.4 Radiomodificadores

Os radiomodificadores atuam por vezes como radioprotetores ou radiosensibilizadores, e em alguns casos como ambos em tecidos diferentes e isto vai depender de diferentes fatores metabólicos. Um radiomodificador que atua como radioprotetor é caracterizado assim por ser administrado antes da exposição à radiação ionizante, fazendo a proteção do tecido normal. Quando o radiomodificador atua como radiosensibilizador, ele possui a capacidade de sensibilizar o tecido normal à radiação ionizante. (SOUZA et al., 2000).

3.4.1 Radiossensibilizadores

Os radiossensibilizadores são conhecidos como compostos radiomodificadores e radiossensibilizadores e são decorrentes da descoberta que, no princípio do século passado, os tecidos irradiados na ausência de Oxigênio (O_2) apresentavam uma resistência de 2,5 a 3 vezes maior que tecidos irradiados na presença deste gás. Como consequência destas descobertas, pesquisas foram iniciadas em busca de protocolos que pudessem ser úteis no tratamento de tumores e na década de 1950, foi apresentado o primeiro modelo de hipóxia em tumores (BUMP et al., 1983).

3.4.2 Radioprotetor

Como foi descrito anteriormente, alguns compostos quando associados à radiação oferecem resultados positivos no combate a tumores, algumas vezes é necessário reduzir os efeitos colaterais da radiação ionizante nos organismos. Então, nestes casos, usa-se outra classe de radiomodificadores, que são os radioprotetores. Os radioprotetores são administrados antes da exposição à radiação ionizante, tendo como finalidade reduzir os danos resultantes da mesma, podendo ser sintéticos ou naturais (JAGETIA & BALIGA, 2002).

Os compostos que são classificados como radioprotetores, ou seja, que possuem ação radioprotetora, devem ter sua atuação evitando danos aos órgãos e tecidos, não serem tóxicos ou apresentarem baixa toxicidade, demonstrando uma proteção relevante contra os efeitos da radiação. Outro ponto importante é que estes não devem se acumular e produzir danos irreversíveis, devem possuir um extenso período de proteção, devem poder ser administrados com outras drogas, podendo ser armazenados de 2 a 5 anos em condições normais ou extremas, e também serem tolerados e não interferir com o comportamento (JAGETIA & BALIGA, 2002).

3.5 Histórico LED

A grande descoberta do diodo emissor de luz (LED), está diretamente ligada a dois nomes: Henry Joseph Round do laboratório de Marconi que observou o fenômeno de eletroluminescência em 1907, no qual era usado um detector e um cristal de carboneto de silício (ROUND, 1907). O segundo nome é do cientista Russo, Oleg Vladimirovitch Losev, que em seus artigos científicos, publicados entre 1924 e 1930, forneceu um estudo abrangente sobre o LED e delineou as suas aplicações. Suas pesquisas realizadas foram publicadas em revistas da Alemanha, União Soviética e Inglaterra, porém estas não foram colocadas em prática durante algumas décadas (LEE, 2003; ZHELUDEV, 2007). Oleg entendeu a natureza fria, ou seja, não térmica da emissão do LED, mediu o limiar de emissão de luz e também entendeu que a emissão está relacionada à ação de diodo e foi medido, com detalhes, a dependência tensão-corrente característica do dispositivo eletrônico.

No começo da década de 70, os semicondutores surgiram, possibilitando acesso à tecnologia de baixo custo, simples manuseio e com respostas terapêuticas. Primariamente as substâncias semicondutoras utilizadas eram o arseneto de gálio (GaAs), porém com os avanços tecnológicos houve a possibilidade do uso de materiais novos como semicondutores: InGaAsP e AlGaInAs (SCHUBERT, 2006). Os LEDs são a junção de duas ou mais substâncias semicondutoras distintas, n – doped e p – doped. O n – doped possui grande quantidade de elétrons e o p – doped possui carência de elétrons ou buracos, sendo que os elétrons n – doped se conectam aos buracos do elemento p – doped (HALLIDAY et al., 2009). Impurezas ou dopagem são resultantes da alteração do desempenho dos condutores que ocorre em consequência à substituição de átomos. Semicondutores dopados com átomos doadores de elétrons da banda de condução ou tipo (n) são carregados negativamente. Os semicondutores contendo átomos aceitadores são do tipo (p), ou seja, carregam uma carga positiva. mostram buracos na banda de valência. A interação eletrônica que ocorre entre o material que retira elétrons e a carga doadora contribui para a liberação espontânea de fótons do LED (HALLIDAY et al., 2009). Os LEDs emitem comprimentos de onda entre 247 e 1300 nanômetros, do espectro ultravioleta ao espectro infravermelho. O LED possui luz monocromática, luz que não é coerente e não é colimada, porém, suas respostas terapêuticas não são distintas quando comparado ao LASER (DOURADO

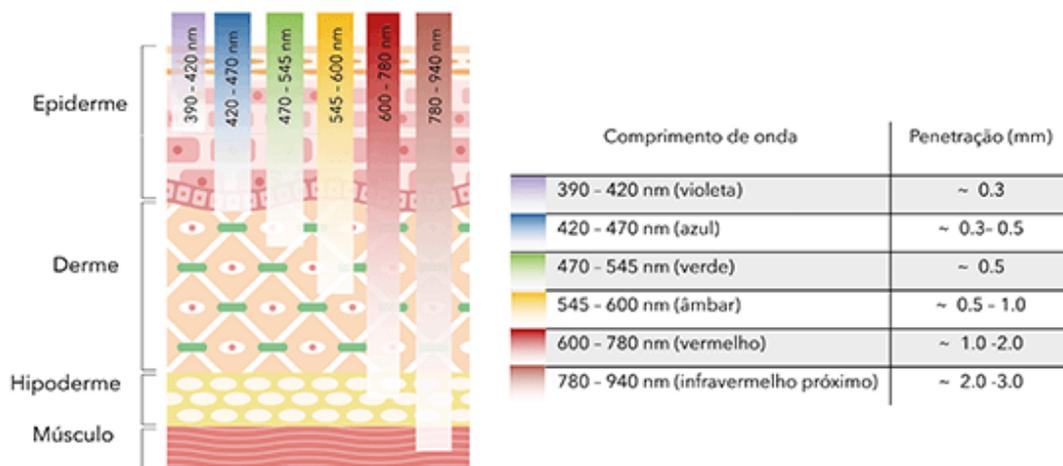
et al., 2011). Há reparo (MEYER et al., 2010), cicatrização de ferida, alívio da dor e inflamação (DUJOVNY et al., 2017), proteção contra o estresse oxidativo nos processos inflamatórios (SILVEIRA, et al., 2016), terapia adjuvante no esporte, depilação, reparo tecidual, e tumores epiteliais (FERRARESI et al., 2016).

3.5.1 Interação do LED e laser com o tecido biológico

A capacidade de absorvância, refração, reflexão e espalhamento, são fatores que estão associados às interações entre os fótons do LED e LASER e os tecidos biológicos. Na absorvância, o fóton que é emitido pelo LED e LASER divide sua energia com receptores fotossensíveis à luz, que são chamados de cromóforos. Esses cromóforos agem como catalisadores através de uma reação fotoquímica. (KARU, 1988; KOLESAROVÁ, 1999). A interação do LED e LASER com o tecido biológico é baseada em mecanismos e respostas chamadas fotobiomoleculares. A capacidade de absorção e espalhamento entre os tecidos alvos são eventos primordiais. A mitocôndria é necessária para desencadear a cascata de sinalizações e alterações de propriedades da oxidação de enzimas terminais da cadeia respiratória, sendo citocromo C oxidase ou IV complexo da cadeia de transporte de elétrons, e moléculas especializadas: porfirinas e flavoproteínas (BEAUVOIT et al., 1995; MCBRIDE et al., 2006; TATA e WAYNANT, 2011; KARU, 1999; FERRARESI et al., 2016). É esperado que haja produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na fotobiomodulação. A ROS (espécies reativas de oxigênio) é grandemente tóxica na terapia fotodinâmica (PTD) no qual há grande produção de ROS. No entanto, LED e LASER de baixa potência, há pouca produção de ROS quando o tecido biológico é irradiado com energias de Joules $\pm 4 \text{ J/cm}^2$ (LAVI et al., 2003; LUBART et al., 2005). A ROS vai funcionar como sinalizador bioquímico extremamente relevante para mediar as atividades celulares, como: proliferação e síntese de proteína e transdução. Quando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou superóxido (O_2^-) são produzidos em pouca quantidade, há o aumento transitório de Ca^{2+} celular responsável pela sobrevivência celular. No entanto, as altas doses de cálcio podem ser extremamente tóxico para as células e também, a produção de O_2^- e H_2O_2 podem proporcionar a produção do radical hidroxila (OH^\cdot), que é altamente letal aos organismos vivo por meio das reações de Fenton ou Haber-Weiss (LAVI et al., 2003; LUBART et al., 2005). A água,

hemoglobina e melanina são os principais cromóforos que vão impedir que o fóton adentre ao tecido. A água absorve mais luz em comprimento de ondas acima de 1300 nm fazendo a penetração ao tecido prejudicada e a melanina absorve mais luz em comprimento de ondas abaixo de 830 nm. O infravermelho próximo está na faixa do espectro ideal para penetrar ao tecido (figura 1) (PRYOR e MILLIS, 2015).

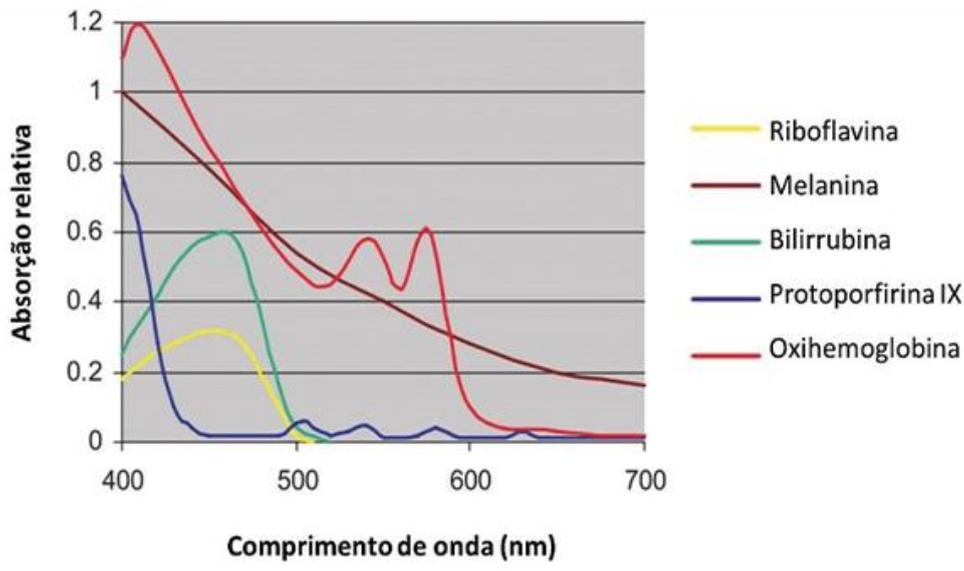
Figura 1 - Profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda.



Fonte: NETO, J.A., 2023

Comprimentos de onda de até 600 nm de LED e LASER, apresentam alta absorção em cromóforos: melanina e hemoglobina. Os comprimentos de onda entre 600-700 nm são utilizados com grande frequência para tratamento de tecidos superficiais (figura 2).

Figura 2 – Espectro de absorção dos cromóforos da pele.



Fonte: NETO, J.A., 2023.

3.6 *Danio rerio* (zebrafish)

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como zebrafish é um peixe que possui origem no Sul da Ásia, que vive em água doce, com hábitos noturnos, possui alta taxa reprodutiva, sua fecundação é externa, boa adaptação para a criação em cativeiro e o seu embrião é transparente, possuindo um desenvolvimento rápido, com evolução de embrião para estágio de larva entre 48 horas a 72 horas. Este peixe chega em seu estágio adulto aos 3 meses de vida e sua expectativa de vida média é de 4 anos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

No ano de 1934, o *Danio rerio* foi utilizado na ciência (CREASER, 1934), porém só em 1981, após a publicação do trabalho de George Streisinger e sua equipe que este modelo animal passou a ser popularizado, onde foram descritos métodos para gerar mutações por meio de ginogênese (STREISINGER et al., 1981). Entretanto, o modelo animal zebrafish, consolidou-se no ano de 1996, no qual tiveram diversas publicações sobre os genes e mutações. Já no Brasil, só após 3 anos foi publicado um artigo que usava o zebrafish como modelo animal e também foi o peixe transgênico principiante (FIGUEIREDO et al., 2007). Nos dias atuais, há diferentes

frentes de pesquisas que utilizam o zebrafish como modelo animal, para variadas áreas de estudo como meio ambiente, ecologia, toxicologia, farmacologia, comportamental e outros.

Figura 3 – Peixe *Danio rerio* adulto



Fonte: autora da dissertação.

Um dos motivos para o aumento do uso de zebrafish como modelo animal se dá pelo seu modelo genético, pois o genoma dessa linhagem é parecido com o do ser humano, além de que os primeiros dias de desenvolvimento após fertilização, o embrião possui transparência, o que facilita a visualização do seu desenvolvimento.

Um fator bastante relevante é o zebrafish possui alta taxa de reprodução, fazendo com que os testes e pesquisas sejam em grande escala e sejam mais fidedignos (D'AMORA; GIORDANI, 2018). Diversos artigos relatam algumas mudanças genéticas do zebrafish, com isso há a possibilidade de indução de mutações para diferentes fins como: patologias e também na parte neurológica. (GAO et al., 2017; LEE et al., 2021).

A espécie zebrafish possui preferência por viver em sociedade, formando cardumes pequenos. A fêmea geralmente libera hormônios inibitórios, fazendo com que a hierarquia seja evidente em relação a outras fêmeas, impedindo-as de liberar feromônios na fase de ovulação. Há também fêmeas que brigam para exercer a hierarquia e isso muitas vezes pode interferir de maneira direta na reprodução. Os feromônios liberados pelas fêmeas são atrativos para os machos e no momento da reprodução. Os machos, por sua vez, liberam hormônios para induzir a ovulação das

fêmeas, fazendo com que a quantidade de embriões seja maior, e conseqüentemente sua qualidade também, diferente de fêmeas que não vivem em sociedade (LAWRENCE e HARPER, 2016). Seu ciclo circadiano deve ser respeitado, sendo utilizado geralmente um ciclo de 14 horas de claro e 10 de escuro. Estes fatores são extremamente importantes a serem seguidos, pois sua qualidade de vida e seu comportamento dependem deste padrão (LAWRENCE, 2007).

Além de outras características mencionadas anteriormente, existem outros fatores como: baixo custo, tolerância alta de variações do ambiente e facilidade de manutenção, que são características relevantes para a utilização do zebrafish como modelo animal em pesquisas (LAWRENCE, 2007). Em 2013, um estudo mostrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano, possuem correlação com os genes encontrados no peixe zebrafish, sendo que 84% dos genes, estão associados a doenças de humanos (HOWE et al., 2013).

3.6.1 Genética do zebrafish

Especificamente, seu desenvolvimento embrionário acontece dentro de 72 horas, passando depois para fase larval, possuindo seu desenvolvimento externo ao corpo materno. O desenvolvimento embrionário passa por as seguintes fases: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, patologias, realizando bloqueio gênico e mutações (SIEBEL; BONAN, 2015). Na fase de faríngula o zebrafish já possui musculatura e alguns órgãos como o coração. Na fase larval, ele já possui praticamente todas as estruturas de seu organismo (SIEBEL; BONAN, 2015). Abaixo, na figura 4, estão demonstrados os diferentes modelos de animais utilizados em pesquisa e suas diversas vantagens.

Figura 4 - Comparação de vantagens entre modelos animais para uso de análise de toxicidade.

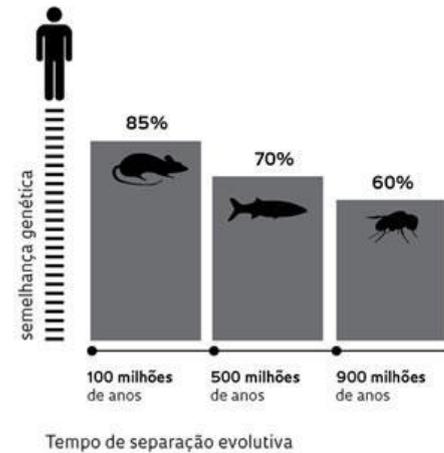
Os modelos e suas vantagens

Taxa de reprodução elevada, baixo custo de manutenção e desenvolvimento do embrião fora do corpo materno são alguns dos atrativos do *zebrafish*

	 DROSÓFILA	 ZEBRAFISH	 CAMUNDONGO
FECUNDAÇÃO	Interna	Externa	Interna
DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO	Externo	Externo	Interno
EMBRIÃO	Não transparente	transparente	Não transparente
PRODUÇÃO DE FILHOTES	100 ovos/dia	100 ovos/dia	10 filhotes/2 meses
TEMPO ATÉ A IDADE REPRODUTIVA	20 dias	60 a 90 dias	85 dias
MANUTENÇÃO DIÁRIA	-	R\$ 0,60	R\$ 8,00
PLANO CORPORAL	Invertebrado, 6 patas e asas	Vertebrado, sem patas	Vertebrado, 4 patas

FORTE JOSÉ XAVIER NETO / LNBIO, MONICA RYFF VIANNA / PUC-RS E DENIS ROSEMBERG / UNCHAPECO

Comparação com o ser humano

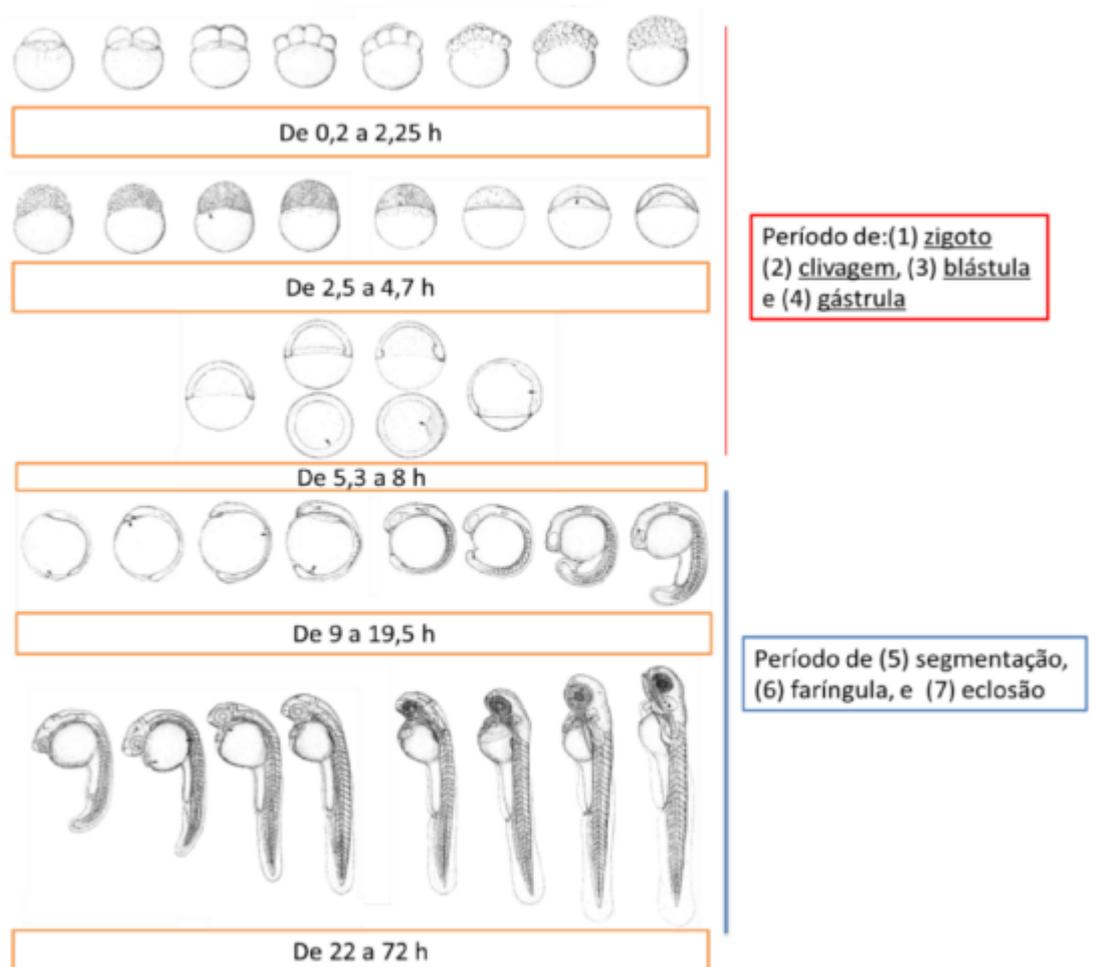


Fonte: Medrades, J.P., 2023.

3.6.2 Fish Embryo Toxicity (FET – Test)

No ano de 2013, foi criado o Fish Embryo Toxicity (FET) que foi preconizado para testes embriotóxicos agudos (OECD n° 236, 2013). Para realização do teste é utilizado os embriões fertilizados, alguma substância de teste, controle positivo e negativo e, geralmente, 5 concentrações da substância teste. Kimmel et al., (1995) demonstraram o desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish, demonstrado na Figura 5, e que é utilizado atualmente como base para embriotóxicos.

Figura 5 - Processo de desenvolvimento embrionário do zebrafish (*Danio rerio*) adaptado de Kimmel et al. (1995). Embriogênese em 72 horas pós-fertilização (hpf): (1) o zigoto, (2) clivagem, (3) blástula, (4) gástrula, (5) segmentação, (6) faríngula, (7) e os períodos de incubação (eclosão).



Fonte: Piau, T.B., 2021.

3.7 Estudos toxicológicos

Estudos toxicológicos são responsáveis por entender os efeitos prejudiciais que foram e são provocados por algum agente tóxico. Em testes de toxicidade é possível avaliar alterações que ocorrem em algum organismo biológico após serem expostos a alguma substância. Alterações decorrentes de exposição a diferentes substâncias tóxicas podem ser irreversíveis ou não, provocando algum efeito na molécula, na célula, no tecido e até no órgão dos organismos vivos, podendo em alguns casos, levar à morte (CHOUERI, 2015). Muitos protocolos para ensaios toxicológicos, como o FET teste mencionado anteriormente são recomendados pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), ensaios estes que são aceitos positivamente pela comunidade científica.

3.7.1 Biomarcadores genéticos

Estudos toxicológicos utilizam biomarcadores para avaliar o efeito das substâncias testadas, contaminantes de meio ambiente e os biomarcadores genéticos são os mais utilizados pois apresentam dano genotóxico (CHOUERI, 2015). E estes biomarcadores podem ser celular, fisiológico, bioquímico e até comportamental. São encontrados em tecidos, fluidos ou comportamento do organismo após ou durante exposição da substância ou contaminante (CHOUERI, 2015). Biomarcadores são interessantes, pois as substâncias estranhas em contato com o organismo podem causar mutações, podendo ser de origem teratogênica, hereditária e até mesmo cancerígena (MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998).

Algumas moléculas são capazes de transpassar a carioteca e fazer interação direta com o DNA, causando desnaturação e degradando a dupla hélice, e consequentemente produção de micronúcleo e aduto (BERRA, 2008). Com a presença de moléculas tóxicas, há sua instabilidade e reatividade e esta molécula se liga a lipídios, bases nitrogenadas e proteínas, fazendo a quebra das ligações, prejudicando a estrutura de origem. Danos como este são classificados como biomarcadores de resposta biológica, são bastante precisos e com grande sensibilidade, podendo ser utilizados em ensaio cometa, alterações nucleares e teste de micronúcleo, dependendo da necessidade do estudo (SADAUKAS-HENRIQUE et al., 2014).

3.7.2 Micronúcleos

Os micronúcleos (MNs) são corpos pequenos e extranucleares que se originam de cromossomos acêntricos ou de fragmentos de cromátides durante a fase conhecida como anáfase e pela segregação retardada de cromossomos também durante a anáfase, que por sua vez, não estão inclusos no principal núcleo durante a fase telófase (FENECH et al., 2011; LUZHNA et al., 2013). Os agentes tóxicos fazem a indução de quebras de cadeia de DNA que não são reparadas ou mal reparadas, fazendo com que apareçam cromátides ou fragmentos dos cromossomos que não se aderem às fibras do fuso mitótico e não se ligam ao núcleo principal, formando, então o micronúcleo (MN) (FENECH et al., 2020).

Com a formação de MN, ele pode ter alguns destinos como: extrusão pela célula; degradação do MN por autofagia; reincorporação no núcleo principal; ruptura do envelope nuclear do MN; persistência, mantendo por um ou mais ciclos e até mesmo as células com MN podem ser eliminadas por apoptose (GUO et al., 2019).

3.7.3 Testes genotóxicos

A Genotoxicidade é resumida como alterações no material genético, devido a exposição a substâncias que são capazes de produzir este dano. De acordo com a OECD de 2016, no protocolo de número 487 (OECD, 2016), os efeitos genotóxicos listados são: alterações danosas no DNA ou cromossomos, como mutações gênicas, modificações e ligações de nucleotídeos, aberrações cromossômicas e alterações cromossômicas numéricas, rearranjos quebras e deleções.

3.7.4 Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

Com a atividade transcricional que é reduzida, devido a má formação do complexo nuclear e também na falha na importação nuclear, os micronúcleos geram um dano para a célula (SADIQUL et al., 2016). Além da avaliação da frequência de micronúcleo (MN), há também a possibilidade de avaliar a frequência de anomalias nucleares, que neste caso, possuem relação com erros que ocorrem durante a mitose e morte celular (FENECH, 2000).

Algumas das anormalidades nucleares são conhecidas como: cariorréxis que é a fragmentação destrutiva do núcleo de uma célula morta, cariólise que é a dissolução completa da cromatina de uma célula moribunda devido à degradação enzimática produzida por endonucleases, binucleação no qual a célula apresenta dois núcleos, que possuem aproximadamente o mesmo tamanho, e, vacúolos nucleares que é uma cavidade dentro do limite nuclear (CARRASCO et al., 1990; SADIQUL et al., 2016). Sendo assim, MN e anormalidades nucleares são indicadores aceitos para evidenciar como estão as células de um organismo vivo e como consequência sua saúde (ERGENE et al., 2007; SADIQUL et al., 2016) pois é um dano genotóxico irreversível para a célula (DEPLEDGE; FOSSI, 1994; SADIQUL et al., 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação no Comitê de Ética

Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, registrada com o nº 01/21 a utilização do zebrafish como modelo animal.

4.2 Criação e Manutenção do Modelo Experimental

Os peixes adultos foram adquiridos através de doação da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Após ter sido realizado o transporte adequado dos peixes até o Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA), os peixes passaram por aclimatação. O saco de transporte foi lavado por fora e retirado uma pequena quantidade de água de seu interior, deixando o suficiente para cobrirem os peixes confortavelmente. O saco foi adicionado dentro do aquário com água, de maneira que ficasse flutuando, dando início a aclimatação para que a temperatura se igualasse. Após 15 minutos de flutuação, foi adicionado um pouco de água do aquário, a cada 5 minutos, até que o volume de água do saco fosse triplicado para equiparar o pH. Após este processo foi averiguado a temperatura e pH, assim os peixes foram colocados dentro do aquário, sem a água do saco para que não houvesse grande concentração de amônia. O pH da água foi mantido entre 7.0 e 8.0 e temperatura para cada aquário foi mantida entre 26 a 27 °C com o laboratório climatizado e a oxigenação da água foi realizada através do filtro com bomba (AquaOne) como ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Filtro com bomba do aquário.



Fonte: Autora da dissertação.

Os peixes eram alimentados com ração floculada (TetraMin) 2 vezes ao dia, e com artêmias que eram recentemente eclodidas e filtradas. Para o processo de eclosão das artêmias, que são comercializadas em ovos, era utilizado 1 L de água deionizada com Cloreto de sódio, sendo aeradas durante 24 horas. O ciclo circadiano ideal de luz no laboratório para o zebrafish é geralmente definido em 14 horas de luz e 10 horas de escuridão completa (MATTHEWS et al., 2002). Este ciclo de claro-escuro imita o ambiente natural sendo o ideal para manutenção do relógio circadiano do zebrafish. Para o ciclo claro-escuro, foi utilizado um temporizador que foi programado para ficar 14 horas com luz e 10 horas de escuro, ou seja, ele liga e desliga automaticamente. (LAMMER et al., 2009).

4.3 Reprodução zebrafish

Para a desova, os organismos devem ter entre 4 e 24 meses de idade. Os machos e as fêmeas devem permanecer separados por um período de 7 a 14 dias antes do acasalamento. Os peixes para reprodução foram mantidos em aquários de reprodução em uma proporção de 1 fêmea para 2 machos, separados por uma divisória acrílica transparente que continham perfurações, sendo possível a troca de água contendo feromônios entre eles, o que estimula o acasalamento. (ABNT, 2011).

No aquário de reprodução foram colocadas plantas artificiais para simular o ambiente natural (Figura 7). A reprodução é mais favorável para ocorrer durante o início do dia. A reprodução ocorria no período da manhã, quando se adentrava ao laboratório e ligava-se a iluminação simulando a luz do dia e retirava-se a divisória transparente e assim aguardava-se 40 minutos e se a reprodução ocorria os ovos eram depositados ao fundo do aquário.

Os ovos eram retirados com pipeta pasteur e transferidos em uma placa de petri que continha meio embrionário (40 ml da solução de NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, diluídos em 2 L de água deionizada (Figura 8). Com o auxílio de um microscópio lupa, visualizava-se os ovos fertilizados e não fertilizados, sendo os fertilizados separados para realização do teste. Os ovos fertilizados eram transferidos para uma placa de 24 poços, um ovo em cada poço com 2 ml de meio embrionário em cada poço.

Figura 7 – Aquário de reprodução utilizado nos ensaios com zebrafish.

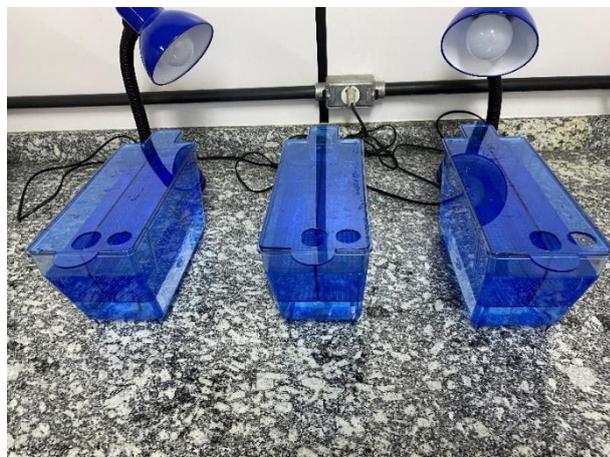


Figura 8 – Preparo da solução para o meio embriônico.



Fonte: autora da dissertação.

4.4 Ensaio com a utilização do LED

Para a realização do ensaio utilizando somente o LED, os ensaios foram realizados em triplicata e os ovos fertilizados transferidos em placa de 24 poços, eram submetidos a irradiação de LED vermelho (660 nm) com 30 mW, durante 1, 6 e 12 minutos, o que resultava em 1,8 J, 10,8 J e 21,6 J. Para a irradiação do LED vermelho, utilizou-se o emissor de LED (Figura 9) (LEDBox – BioLambda).

Figura 9 – Equipamento emissor de LED 660 nm (LEDbox).



Fonte: autora da dissertação.

Em cada poço era depositado 2 ml de água embrionária. Ainda não se sabe ao certo o tempo e os mecanismos da irradiação do LED nos embriões e, por este motivo, foram utilizados organismos de diferentes horas pós fertilização (hpf) que, conseqüentemente, estavam em diferentes estágios de desenvolvimento (DAMASCENO, 2019). Após a colocação de um embrião em cada poço, aguardava-se o organismo atingir 4 horas pós fertilização e assim realizava-se a irradiação com o LED. Ao atingir 6 horas pós fertilização, outras placas eram irradiadas e com 24 horas pós fertilização, mais placas de 24 poços contendo os organismos eram irradiadas.

4.5 Dose letal mediana da radiação gama

Para realização da determinação da dose-letal média da radiação gama, os ovos fertilizados foram transferidos em placa de 24 poços e foram submetidos à irradiação gama. Os ensaios utilizando radiação gama foram realizados em triplicata. Os organismos de 4 hpf e de 6 hpf recebiam as respectivas doses: 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy e 25 Gy e os organismos com 24hpf receberam 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy e 50 Gy. Para isso foi utilizado o Gammacell, do Centro de Tecnologia das Radiações (CETER), que está representado na Figura 10.

Figura 10 – Irradiador de radiação gama tipo Gammaecell.



Fonte: autora da dissertação.

Em cada poço era depositado 2 ml de água embrionária com um embrião em cada poço. Todos os grupos Controle, LED e Radiação Gama foram observados em microscópio invertido durante as 144 hpf e foram anotadas a quantidade de mortes e a presença de alterações nos batimentos cardíacos, deformações da coluna cervical, edema do pericárdio e edema do saco vitelínico, sendo estes parâmetros preconizados no teste embriotoxicológico agudo. (OECD n° 236, 2013).

4.6 Ensaio associando LED com radiação gama

Para o ensaio do LED com radiação gama, os ovos fertilizados eram transferidos em placa de 24 poços e foram submetidos a irradiação com LED em 1 minuto, 6 e 12 minutos. E após a irradiação com o LED, foi feita a exposição com radiação gama, 10% da DL₅₀ em um ensaio e DL₅₀ de radiação gama em outro ensaio. O processo foi igual ao realizado nos ensaios de LED e radiação gama. A mesma análise foi realizada e a exposição foi feita nos mesmos tempos pós-fertilização: 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf.

4.7 Citometria de fluxo para quantificação de micronúcleos

Os organismos de *Danio rerio*, do grupo LED, Grupo Radiação Gama e Grupo LED + Radiação Gama foram dissociados segundo o protocolo de Bresciani et al., 2018, descritos todos os passos abaixo e o como controles negativos, foi utilizado o meio embrionário, controles recomendados pela OECD para avaliações com o *D. rerio* (OECD, 2013).

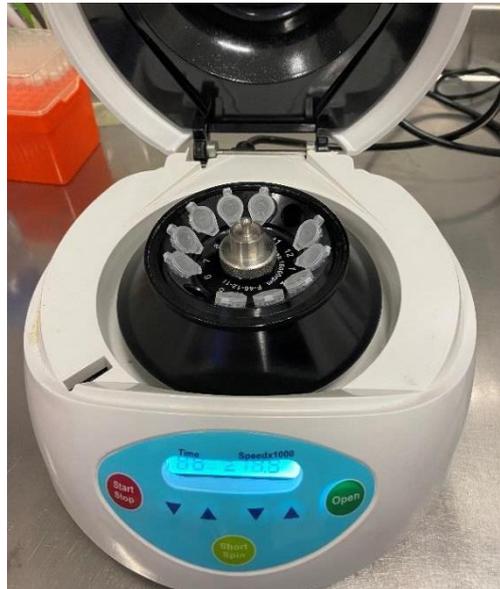
4.7.1 Dissociação de organismos de *Danio rerio* na fase larval

O teste de micronúcleos foi realizado com o organismo no estágio larval com 144 horas pós fertilização. O primeiro passo consistia em ressuspender a colagenase em PBS na proporção de 100 mg/ml e após eram feitas alíquotas de 40 µl e armazenados em -20°C. Para o segundo passo, foi feito o preparo do DMEM-10% FBS e equilibrado a 30°C.

Foi utilizado para o preparo da mistura de dissociação 480µl de 0,25% tripsina-EDTA + 20µl de Colagenase 100 mg/ml (para embriões com 6 dpf). Após o preparo da mistura de dissociação, era feita a eutanásia dos organismos com tricáina metanossulfato, então eram transferidos 20 embriões de cada grupo em um tubo de 1,5 ml e lavado 2 vezes com PBS. Depois da remoção do PBS, era adicionada a mistura de dissociação, feita a homogeneização mecânica dos organismos utilizando pipeta, até que o tecido não fosse mais visível. Foi levado à centrífuga (Figura 11) por

5 minutos em 700 rpm em temperatura ambiente e depois da centrifugação o pellet era visível. Descartava-se o sobrenadante e após era ressuscitado o pellet com 1 ml de PBS.

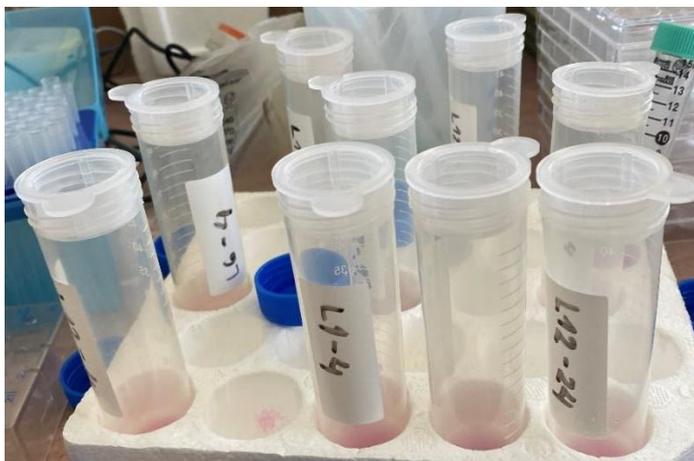
Figura 11 – Centrífuga utilizada para realizar o processo de dissociação dos embriões.



Fonte: autora da dissertação.

Toda a amostra foi filtrada utilizando cell strainer (Figura 12) de 70 μ l em um tubo de 50 ml e o filtro foi lavado com 500 μ l de DMEM-10% FBS. Cada tubo recebeu uma solução de corante de monoazida de brometo de etídio (EMA) (Thermo-Fisher Scientific, E1374) em uma concentração de 8,5 μ g/ml diluída em PBS suplementado com 2% de soro bovino fetal.

Figura 12 – Tubos de 50 ml com os filtros (cell strainer).



Fonte: autora da dissertação.

Os tubos foram transferidos, abertos e dispostos em uma caixa de isopor contendo gelo sendo expostas a uma fonte de luz de led azul por 30 minutos para a fotoativação do composto, o que associa o corante irreversivelmente ao DNA das células inviáveis, que possuem a membrana com a integridade comprometida. Este procedimento tem como objetivo rotular eficientemente as células que não devem ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos. Após este passo, as células receberam PBS com 2% de soro bovino fetal e foram centrifugadas para remoção de corante livre. Foram realizadas duas etapas de lise para liberar núcleos e micronúcleos e marcar o DNA. O primeiro passo consistiu em lise das células utilizando uma solução com cloreto de sódio (0,854 mg/mL), citrato de sódio (1 mg/mL) e IGEPAL (0,3 µL/mL) e 0,4 µM de corante fluorescente verde SYTOX (Thermo-Fisher Scientific, S7020). Esta solução também continha RNase (Sigma, SLB5176V), o que eliminava a chance dos corantes se associarem a moléculas de RNA residual. Após a lise por 60 min em estufa a 37°C, as placas foram centrifugadas e o material biológico recebeu a segunda solução de lise (sacarose 85,6 mg/mL, ácido cítrico 15 mg/mL e SYTOX Green 0,4 µM). Após 30 minutos, o material ficou em temperatura ambiente para leitura no citômetro de fluxo do laboratório do Centro de Biotecnologia - CEBIO, figura 13 (Accuri C6, BD Biosciences).

Figura 13 – Equipamento citômetro de fluxo utilizado para leitura dos MN.



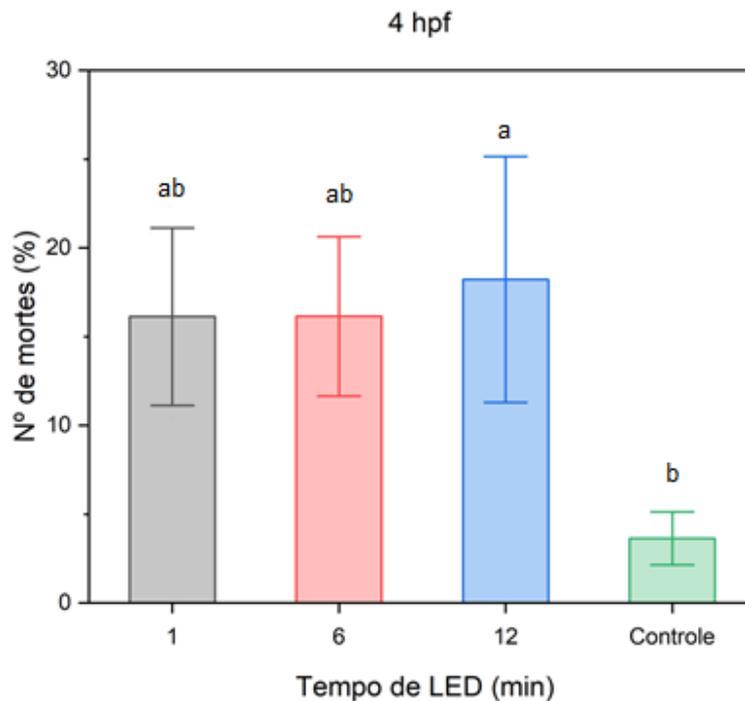
Fonte: autora da dissertação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) em embriões de *Danio rerio*

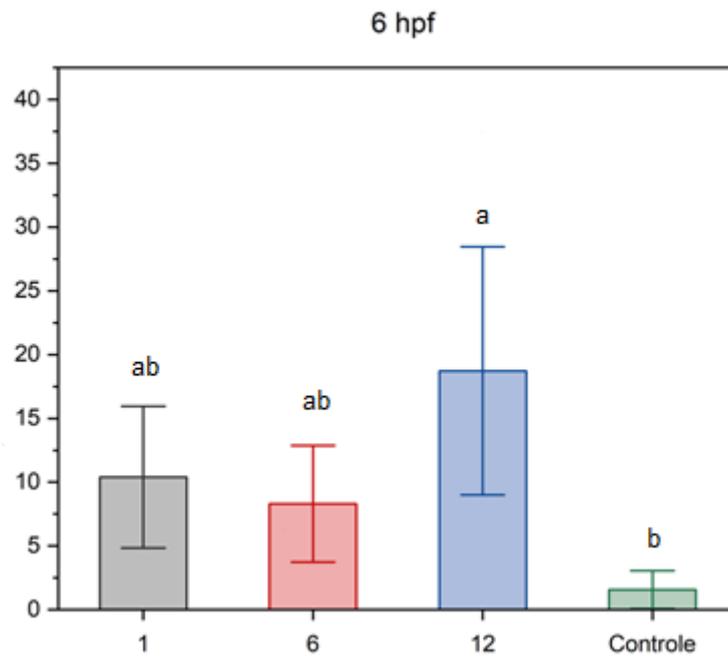
Na análise dos organismos com 4 horas pós-fertilização (Figura 14) expostos com LED 1 min, LED 6 min e LED 12 min, quando comparados com Grupo Controle, levando em consideração a letalidade, houve diferença significativa nos grupos: Controle e LED 12 minutos. Nos organismos com 6 hpf (Figura 15), quando expostos a 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos de LED, houve diferença significativa nos grupos Controle e LED 12 minutos. Em análise com organismos que receberam o mesmo tempo de LED, porém em 24 hpf (Figura 16), não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 14 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 4 hpf.



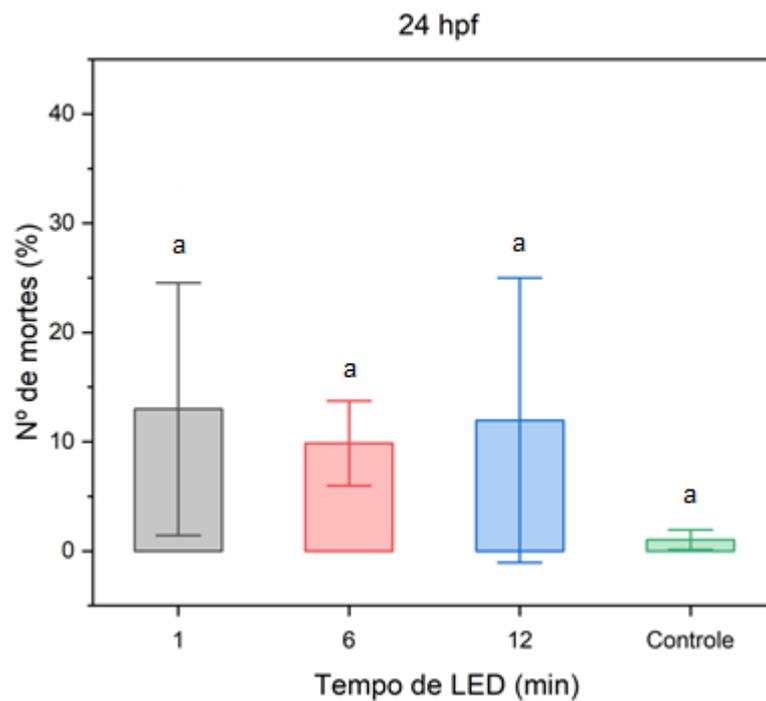
Fonte: autora da dissertação.

Figura 15 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 6 hpf.



Fonte: autora da dissertação.

Figura 16 - Resultado da mortalidade em embriões que receberam LED de 1, 6 e 12 minutos com 24 hpf.

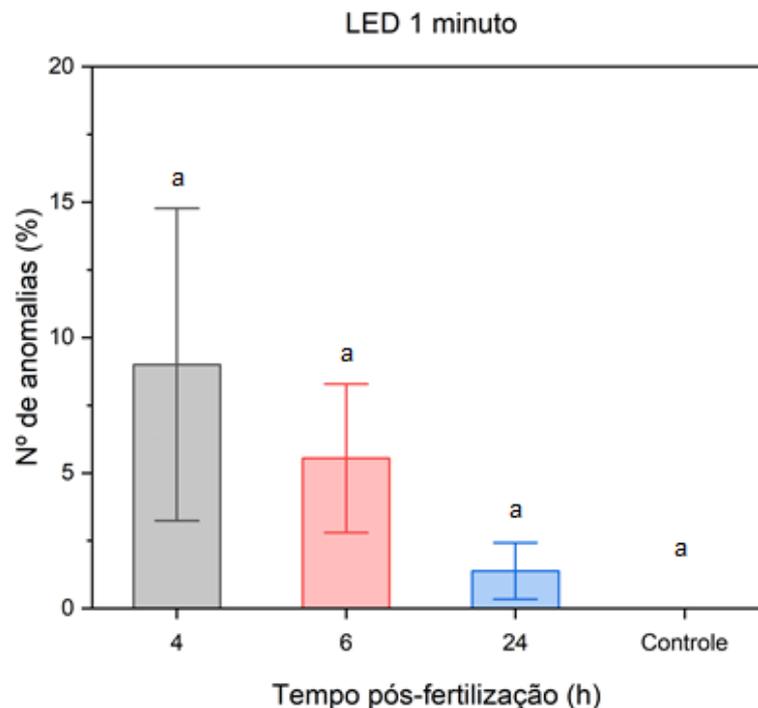


Fonte: autora da dissertação.

Na análise estatística em que comparava os organismos de 4 hpf, 6hpf e 24 hpf que receberam 1 minuto de LED, comparando com o grupo controle, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos. Na mesma análise realizada com os grupos 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf, irradiados com 6 minutos de LED e 12 minutos de LED, quando comparados com o grupo controle, também não houve nenhuma diferença significativa da letalidade.

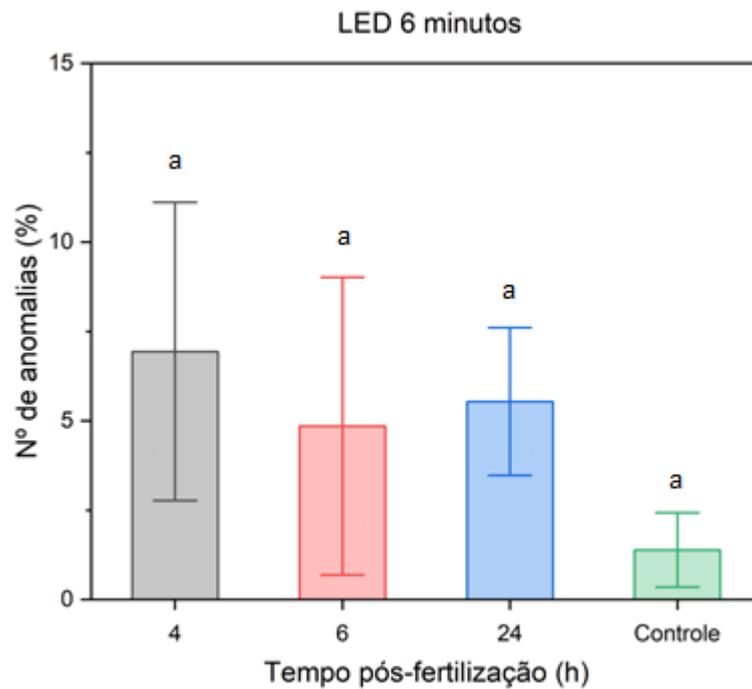
Quanto às anomalias observadas, como edema do pericárdio, escoliose e edema de saco vitelínico, na análise estatística, os organismos irradiados com LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos com 4 hpf, comparados com grupo controle, não tiveram diferença significativa. O mesmo ocorreu na análise de organismos de 6 hpf e 24 hpf, porém, na análise levando em consideração todos os organismos que receberam LED 12 minutos, houve diferença significativa no grupo controle e 4 hpf (Figura 19). Já na análise de todos os organismos que receberam LED 1 minuto (Figura 17) e LED 6 minutos (Figura 18) não houve diferença significativa na frequência de anomalias.

Figura 17 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 1 minuto em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.



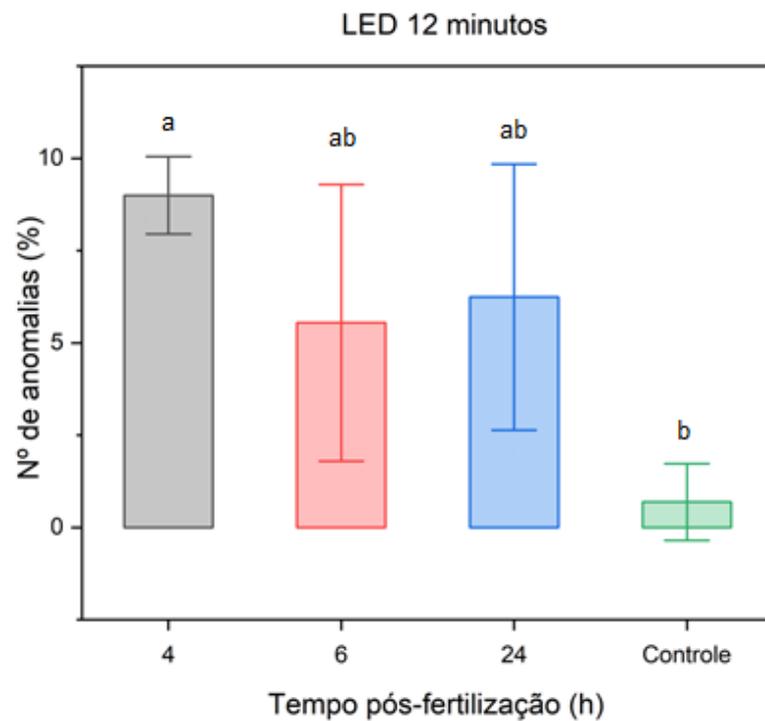
Fonte: autora da dissertação.

Figura 18 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 6 minutos em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.



Fonte: autora da dissertação.

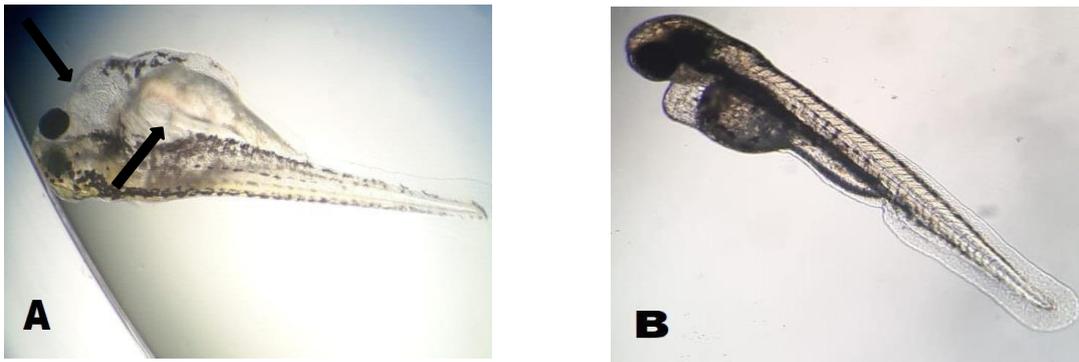
Figura 19 - Resultado de anomalias em embriões que receberam LED de 12 minutos em 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf e grupo controle.



Fonte: autora da dissertação.

Na figura abaixo (Figura 20), são demonstradas algumas das anomalias observadas em larvas de zebrafish que receberam a luz LED vermelha.

Figura 20 - **(A)** Larva de *Danio rerio* exposto em 4hpf à 12 min de LED com edema no pericárdio e alteração no saco vitelínico; **(B)** Larva de *Danio rerio* exposto em 6hpf à 6 min de LED com edema no pericárdio.



Fonte: autora da dissertação.

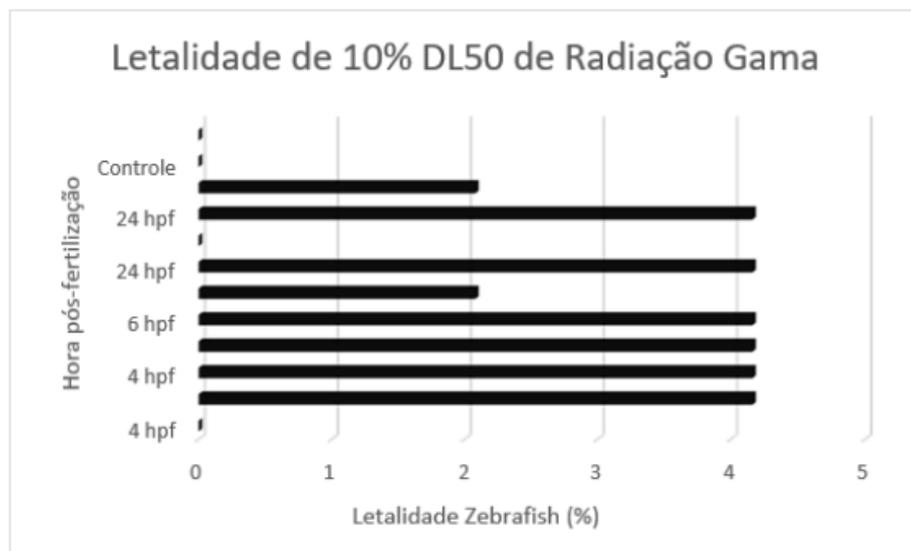
A taxa de mortalidade do grupo controle se manteve igual ou menor que 10% sendo esse um dos critérios da OECD 236 para validar os ensaios. Os padrões utilizados para o manejo de embriões de zebrafish, como, temperatura, qualidade de água, ciclo de 14 horas em claro e 10 horas de escuridão são fatores que podem contribuir para uma baixa mortalidade. Entretanto, tais fatores não são suficientes para evitar a mortalidade nas primeiras 24 hpf (FRAYSSE et. al., 2006).

5.2 Toxicidade de 10% da DL₅₀ da radiação gama em embriões de *Danio rerio*

Foi realizado um ensaio utilizando as doses de 10% da DL₅₀ (4 hpf – 1,12 Gy, 6 hpf – 1,78 Gy e 24 hpf – 1,67 Gy), para comparar com os grupos que receberam apenas dose de LED e com o grupo que recebeu doses de LED e imediatamente os 10% da DL₅₀ de radiação gama. Em análise estatística, levando em consideração a mortalidade (Figura 21) e a quantidade de anomalias, não houve diferenças significativas, porém, em um artigo publicado em 2023, foi realizado um ensaio utilizando embriões de zebrafish. Foram utilizados doses de radiação gama de de 0,01, 0,1 e 1 Gy para observar as mudanças no desenvolvimento do embrião de

zebrafish, ritmo circadiano, genes, RNA e expressão de proteínas e melatonina . Os resultados revelaram que a radiação de 0,1 e 1 Gy pode levar a diferentes graus de apoptose das células nervosas telencefálicas e à formação de estruturas vacuolares. A radiação de 0,1 e 1 Gy poderia reduzir a taxa de eclosão de embriões de zebrafish em 72 hpf e atrasar a eclosão dos embriões. A análise do comportamento circadiano a 120 hpf demonstrou que a dose de radiação de 1 Gy alterou o ritmo circadiano do zebrafish bem como diminuiu a distância, amplitude e fase do movimento, evidenciando que apesar de doses mais baixas como 1 Gy, não aumentarem a taxa de mortalidade, é possível que existe alterações fisiológicas (DAKUP, et al, 2020).

Figura 21 - Letalidade por dose de radiação gama (10% DL₅₀), nos ensaios 1, 2 e 3 respectivamente com 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf.



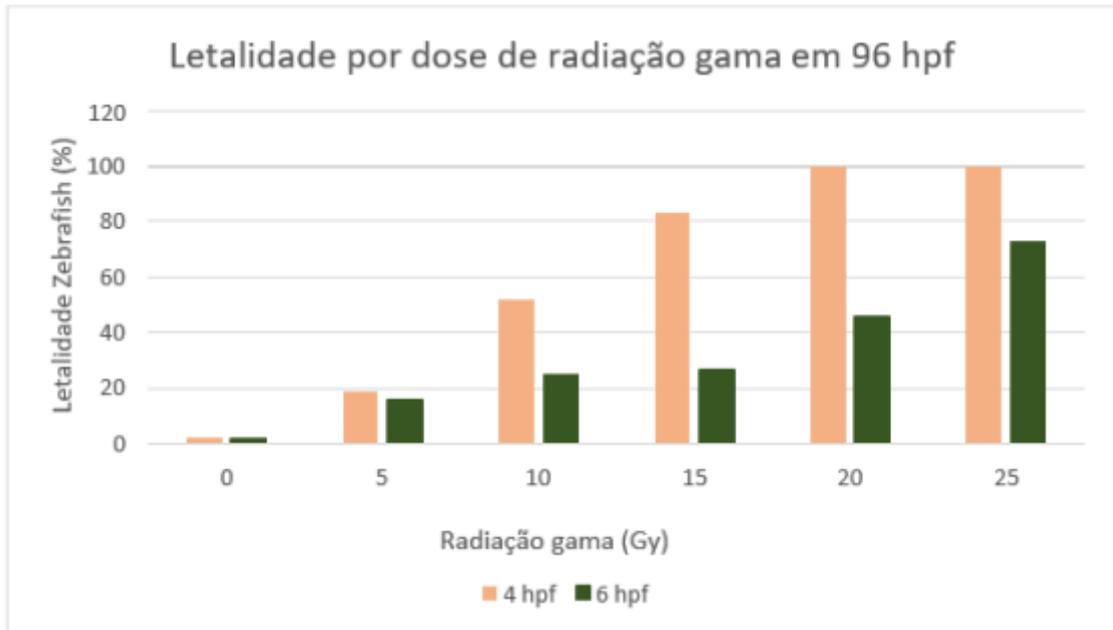
Fonte: autora da dissertação.

5.3 Toxicidade da radiação gama em embriões de *Danio rerio* para obtenção da DL₅₀

No ensaio realizado apenas com doses de radiação gama em 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy e 25 Gy em embriões com 4 hpf e 6 hpf, foram obtidos os seguintes resultados demonstrados na Figura 22, Figura 23 e Figura 24.

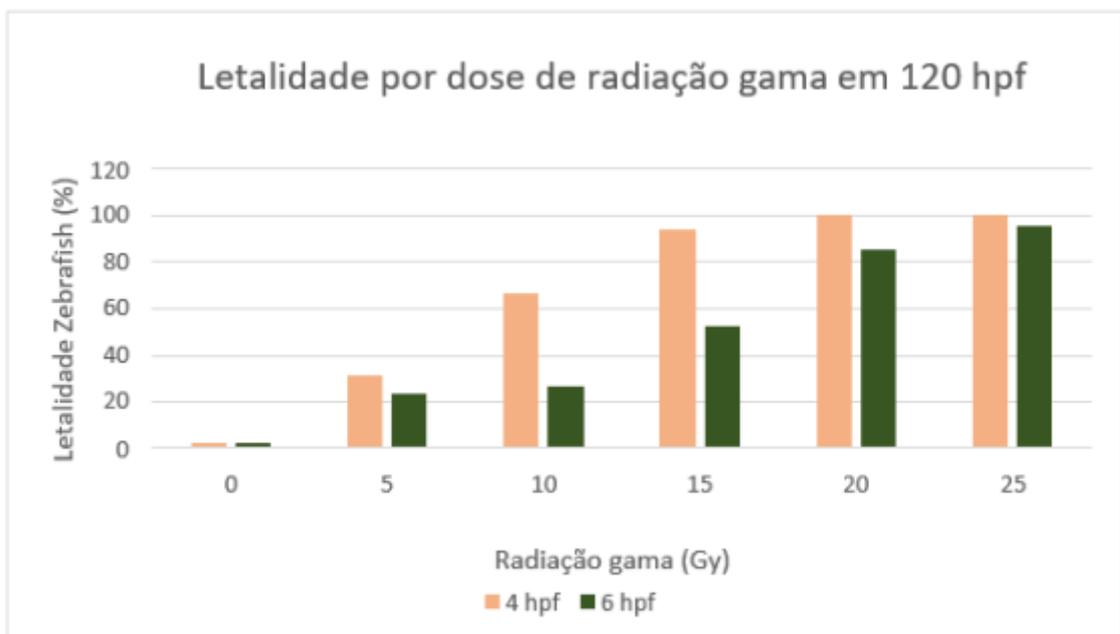
Na Figura 25, é demonstrado o resultado de mortalidade com as doses de radiação 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy e 50 Gy para organismos de 24 hpf.

Figura 22 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 96 horas de ensaio.



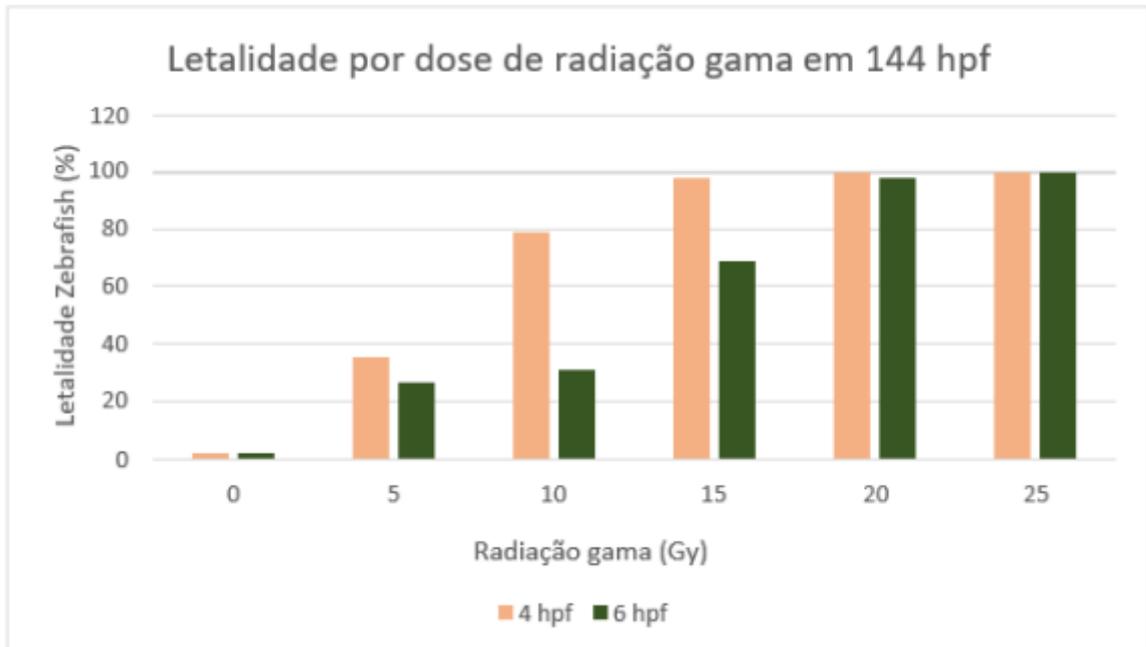
Fonte: autora da dissertação.

Figura 23 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 120 horas de ensaio.



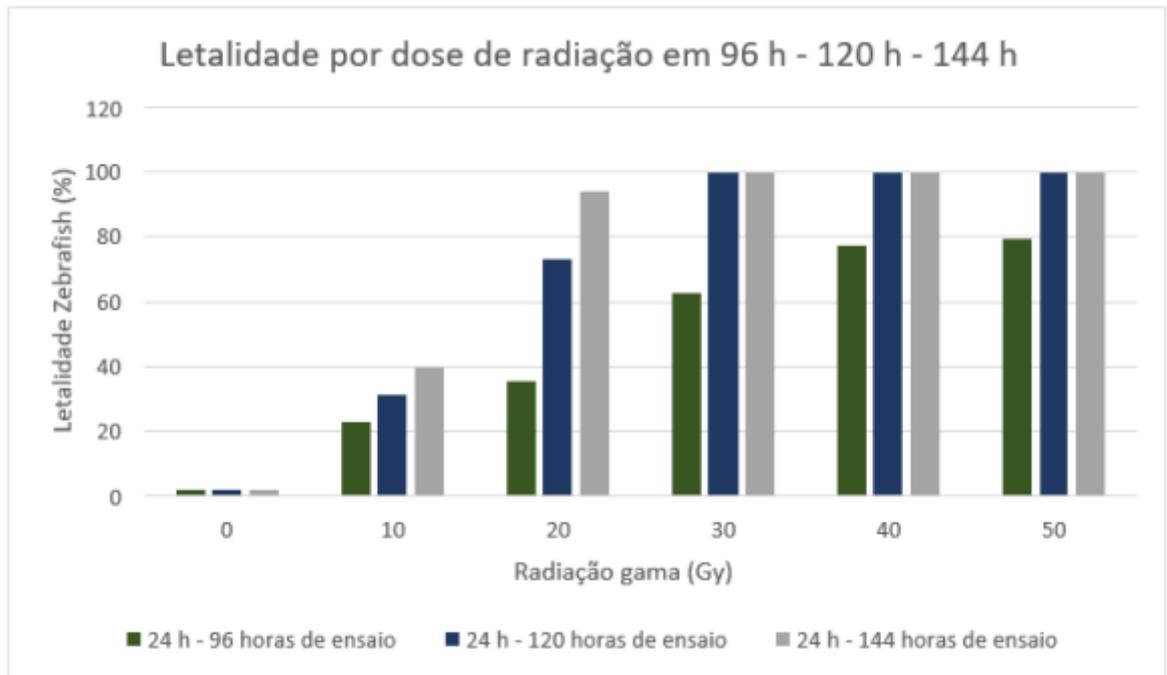
Fonte: a autora da dissertação.

Figura 24 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 4 e 6 horas pós-fertilização em 144 horas de ensaio.



Fonte: autora da dissertação.

Figura 25 - Resultado da letalidade da radiação gama nos organismos com 24 horas pós-fertilização em 96 horas, 120 horas e 144 horas de ensaio.



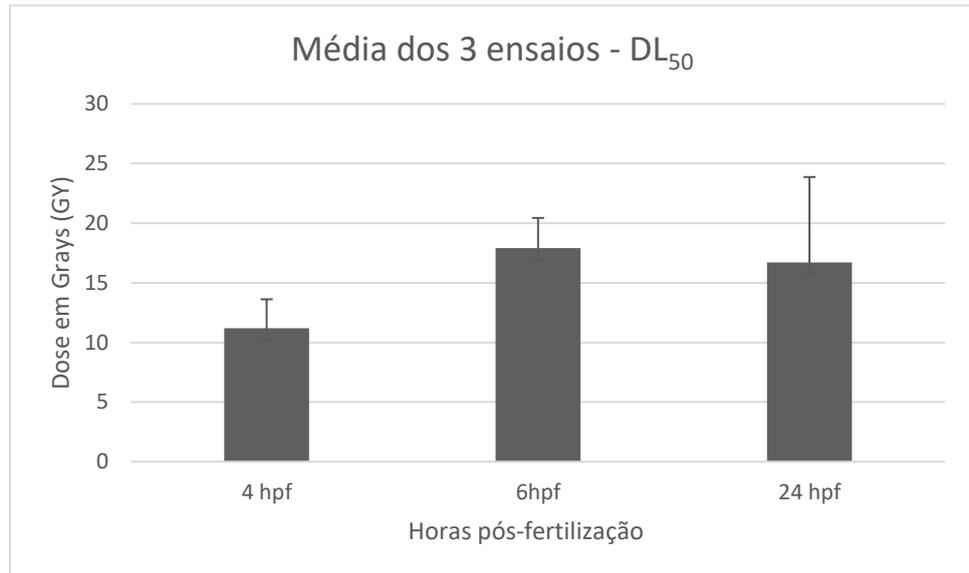
Fonte: a autora da dissertação.

Os organismos com 4 hpf demonstraram maior sensibilidade quando comparados com organismos que foram irradiados após 24 hpf. Em todas as doses de radiação foram observadas deformidades nos organismos e com o passar do tempo a letalidade foi observada. Quanto maior a dose de radiação maior foi a letalidade. As deformidades observadas foram: edema do pericárdio, escoliose e edema de saco vitelínico.

Em um estudo feito por Kumar et al., (2017) foi apontado que há o aumento da taxa de mortalidade de embriões irradiados com radiação gama o que demonstra grande toxicidade nos organismos irradiados, como foi demonstrado neste presente trabalho.

5.4 Valores da DL₅₀ obtida com radiação gama

Figura 26 - Valores da média dos 3 ensaios para obter a DL₅₀ nos organismos irradiados com radiação gama em 4 hpf, 6hpf e 24 hpf.



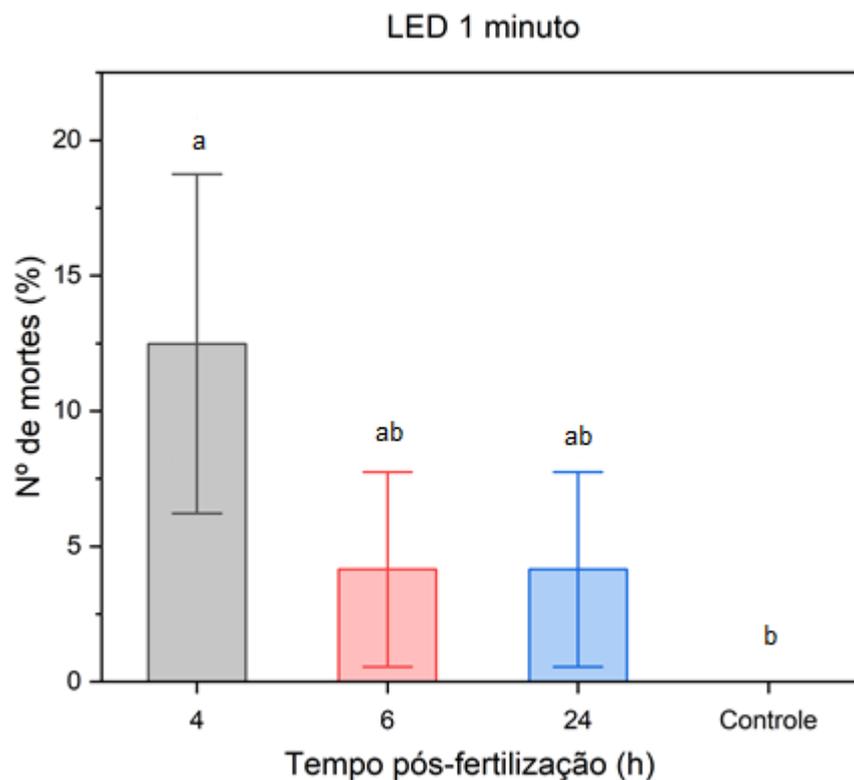
Fonte: autora da dissertação.

Foram realizados 3 ensaios com radiação gama, como demonstrados na Figura 26, para obtenção da DL₅₀ e os resultados em cada ensaio tiveram pequenas variações, porém, foi realizada a média das doses obtidas nos três ensaios para ser utilizada como a dose obtida de DL₅₀.

5.5 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) associado a 10% da DL₅₀ de radiação ionizante em embriões de *Danio rerio*

Foi realizado um ensaio utilizando as doses de 10% da DL₅₀, para comparar com os grupos que receberam apenas dose de LED e com o grupo que recebeu doses de LED e imediatamente os 10% da DL₅₀ de radiação gama.

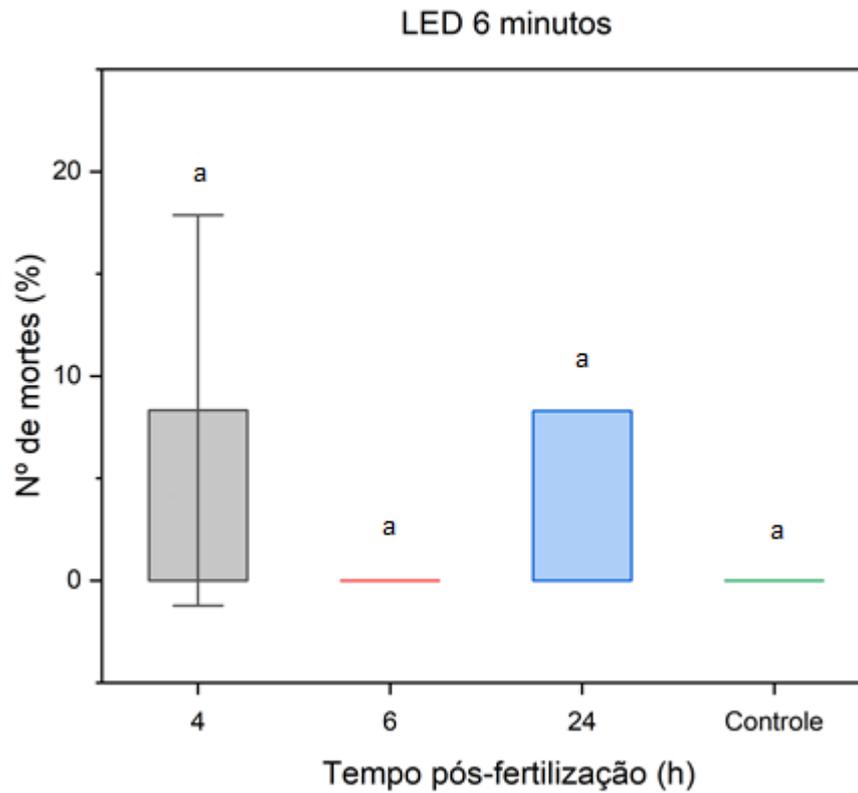
Figura 27 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 1 minuto e a 10% de DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

No LED 1 minuto, Figura 27, é possível observar que as mortes para organismos de 4 hpf foram maiores em comparação com os organismos com mais tempo de vida. Na análise estatística, houve diferença significativa nos grupos controle e 4 hpf.

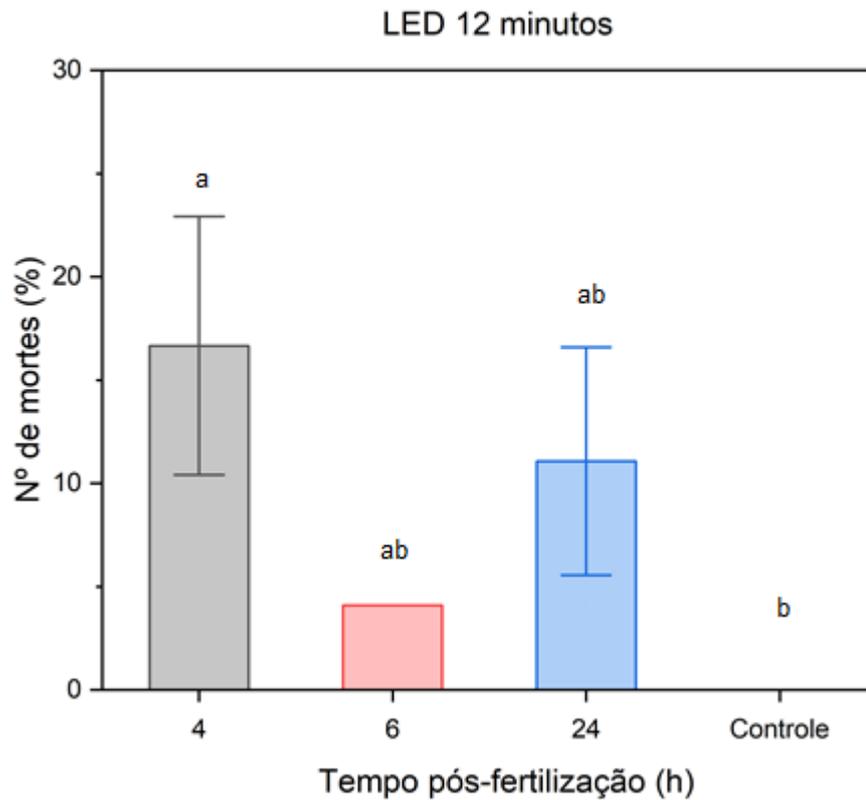
Figura 28 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 6 minutos e a 10% de DL_{50} da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Para organismos que receberam 6 minutos de LED, é possível notar, na Figura 28 que nenhuma das mortes ultrapassam 10% e na análise estatística não houve diferença significativa.

Figura 29 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 12 minutos e a 10% de DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



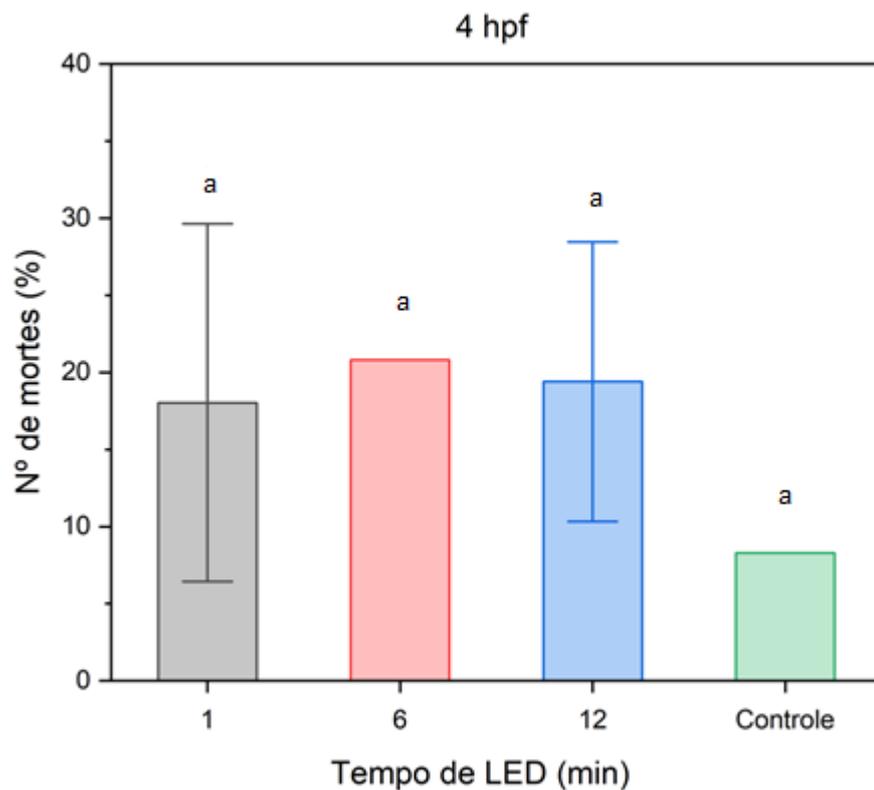
Fonte: autora da dissertação.

No LED 12 minutos, tivemos diferença significativa nos grupos controle e 4 hpf. E organismos com 4hpf, mostrados na Figura 29 foram os que mais tiveram mortes.

5.6 Toxicidade da fonte de luz vermelha (LED) associado a DL_{50} de radiação ionizante em embriões de *Danio rerio*

Neste ensaio foram utilizados os mesmos tempos de LED (1 minuto, 6 minutos e 12 minutos) e logo após irradiados com DL_{50} obtidas para os organismos em tempos diferentes de vida pós-fertilização (4hpf, 6 hpf e 24 hpf).

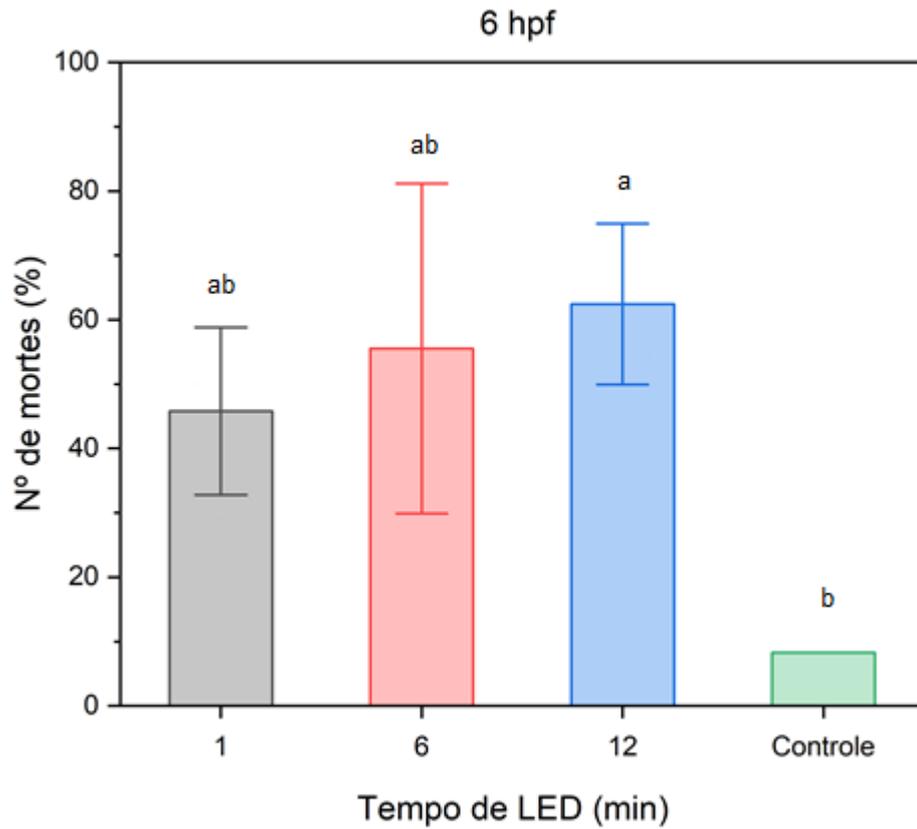
Figura 30 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 4 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL_{50} da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

Na Figura 30, é possível observar que na análise estatística não houve diferença significativa em nenhum dos grupos.

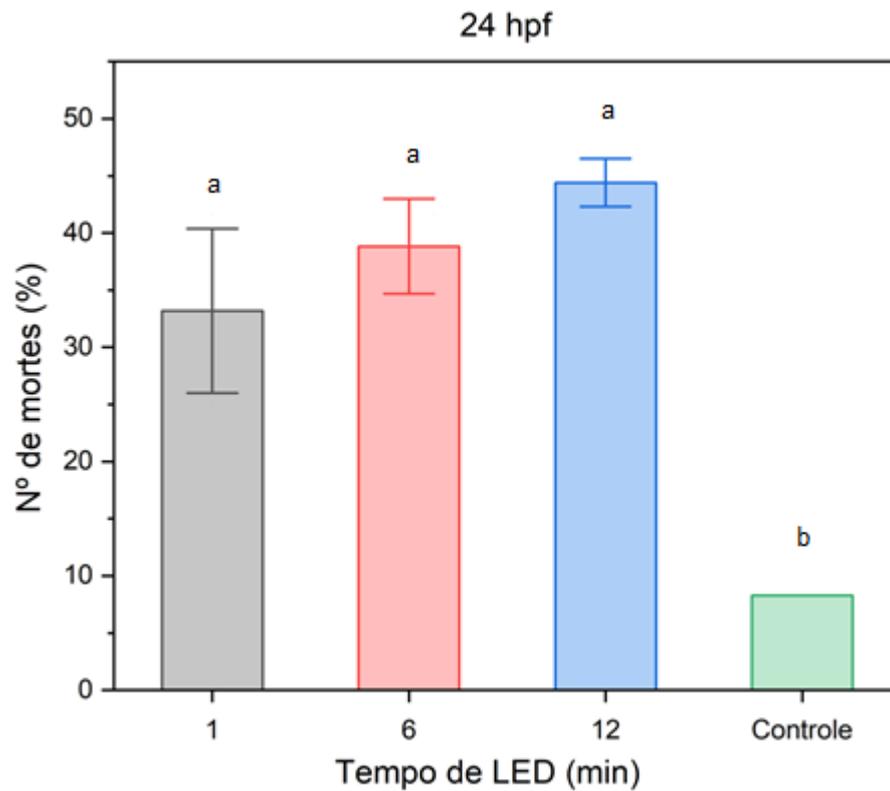
Figura 31 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 6 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

Nos organismos de 6 hpf (Figura 31) que receberam tempos diferentes de LED e depois receberam a dose de DL₅₀, em análise estatística os grupos que tiveram diferença significativa foram controle e 12 minutos de LED com a DL₅₀ de radiação gama.

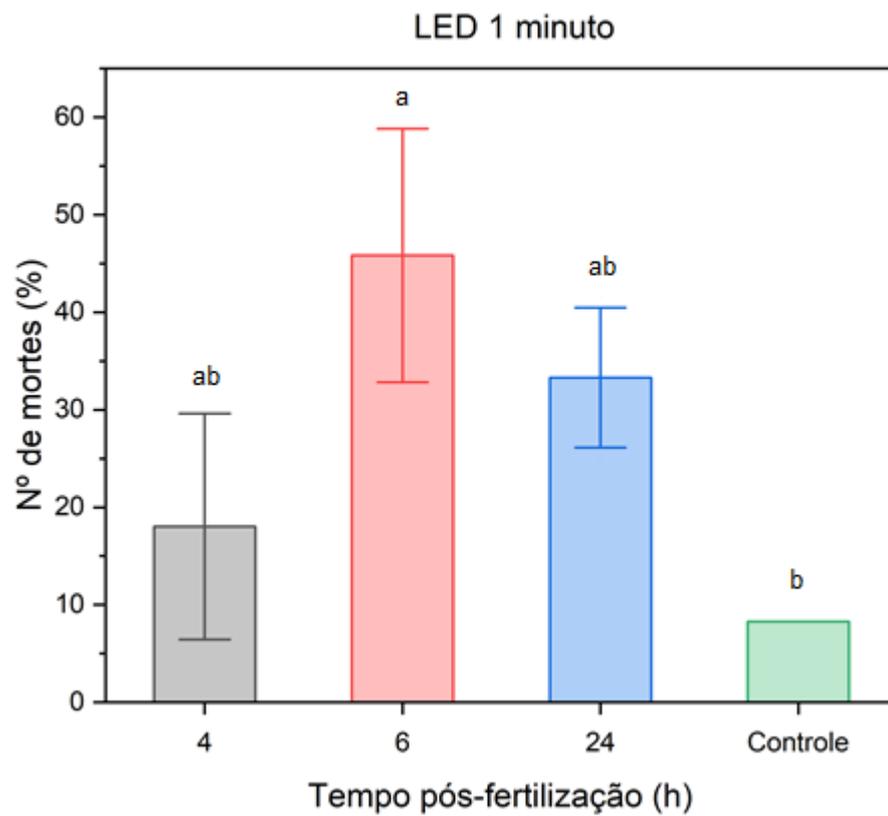
Figura 32 - Valores da mortalidade de organismos expostos com 24 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

É possível notar que para organismos com 24 hpf, observados na Figura 32, houve menor mortalidade quando comparados com organismos de 6 hpf. Na análise estatística, houve diferença nos grupos controle e LED 1 minuto mais DL₅₀ de radiação gama, controle e LED 6 minutos mais DL₅₀ de radiação gama e controle e LED 12 minutos mais DL₅₀ de radiação gama.

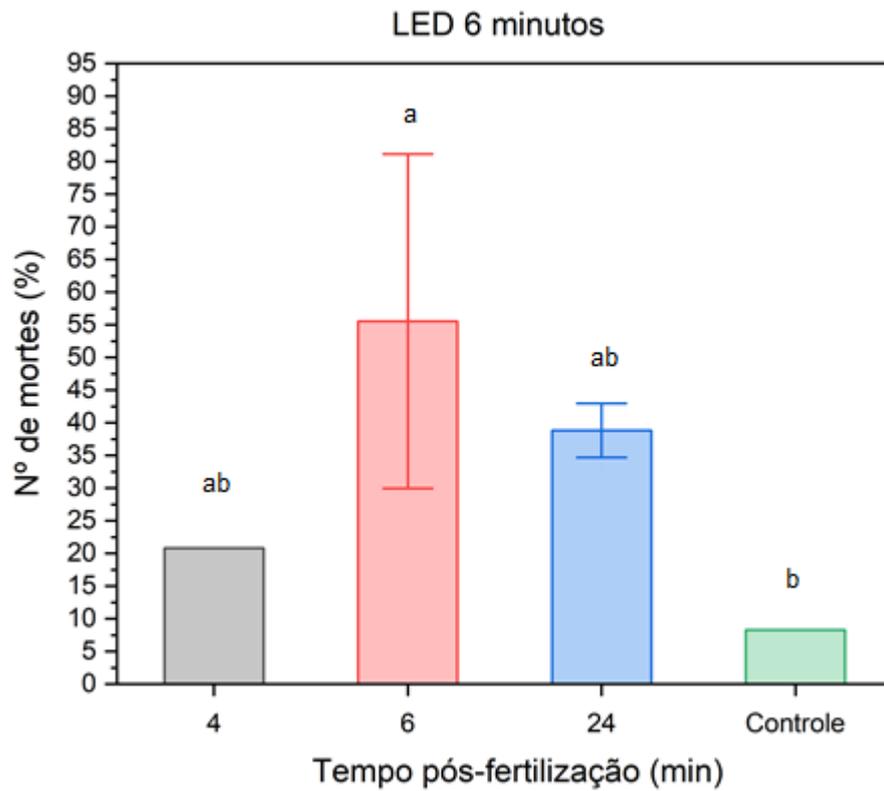
Figura 33 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 1 minuto e a DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Na análise estatística em que diferentes organismos com horas pós-fertilização receberam LED de 1 minuto e DL₅₀ de radiação gama, houve diferença significativa no grupo controle e 6 hpf, mostrados na Figura 33.

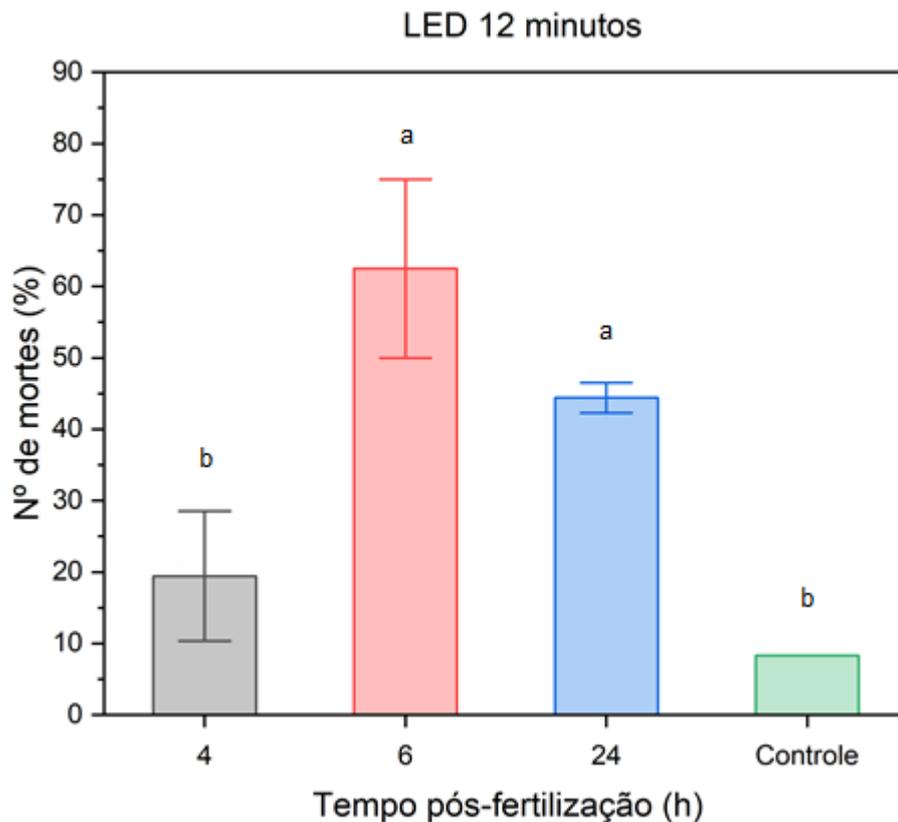
Figura 34 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 6 minutos e a DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Observa-se que na Figura 34, em análise estatística houve diferença significativa nos grupos controle e 6 hpf.

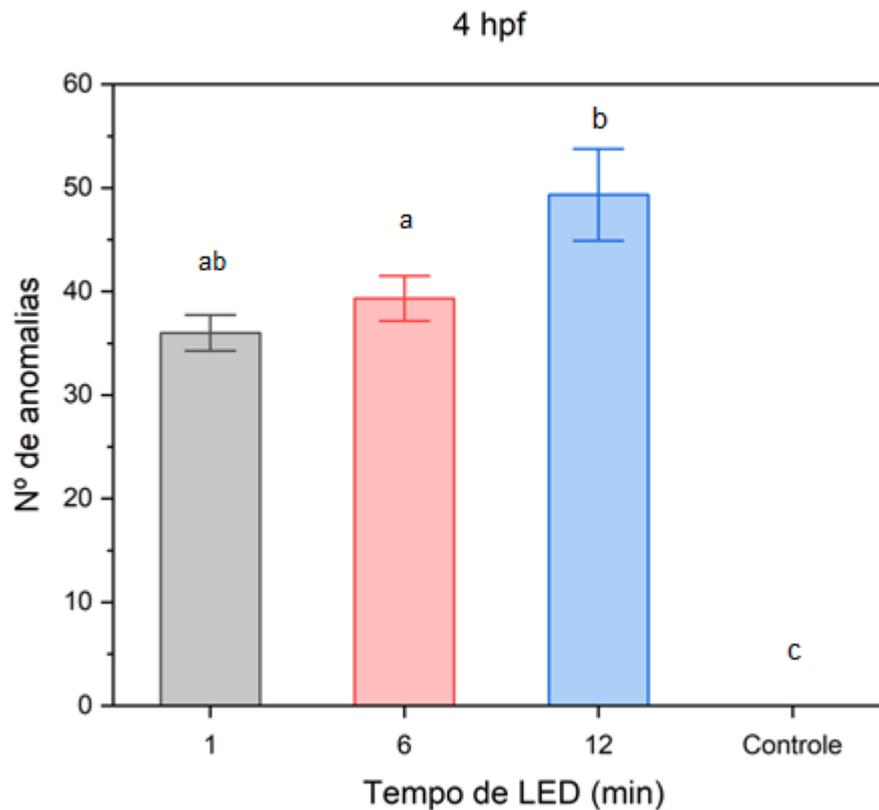
Figura 35 - Valores da mortalidade de organismos expostos ao LED 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Nos organismos que receberam LED de 12 minutos mais a DL₅₀ de radiação gama (Figura 35), houve diferença estatística significativa nos grupos 6 hpf e 4 hpf, controle e 6hpf e controle e 24 hpf. Os organismos que foram expostos ao LED 12 minutos e à DL₅₀ de radiação gama que tiveram a menor taxa de mortalidade, foram os organismos de 4 hpf, apresentando diferença estatística dos organismos de 6 hpf que foram os que tiveram maior taxa de mortalidade.

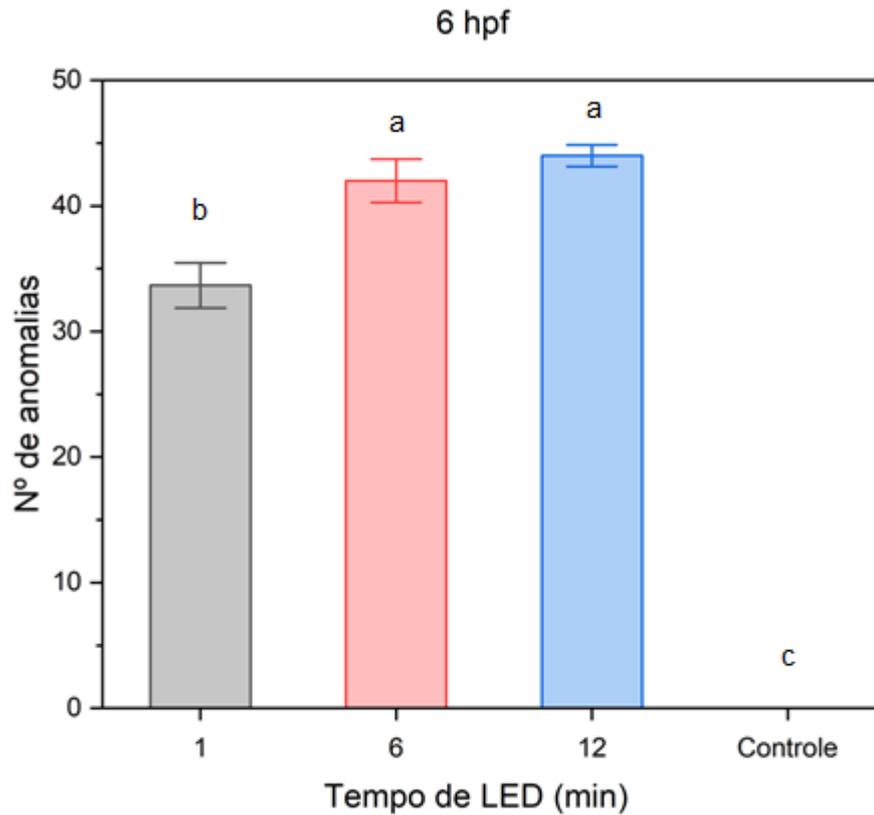
Figura 36 - Valores do número de anomalias de organismos expostos com 4 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

Observa-se na Figura 36, que os organismos de 4 hpf que receberam tempos diferente de LED (1, 6 e 12 minutos) e depois receberam a dose de DL₅₀, em análise estatística os grupos que tiveram diferença significativa foram controle e 1 minuto de LED, controle e LED 6 minutos, controle e LED 12 minutos e LED 12 minutos e LED 6 minutos.

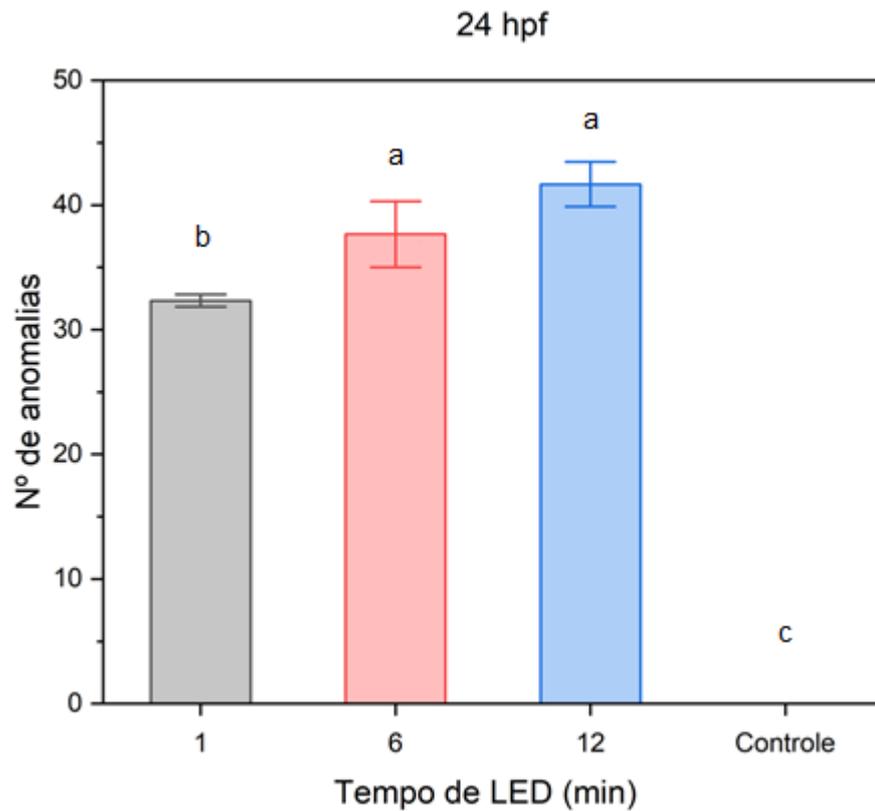
Figura 37 - Valores do número de anomalias de organismos com 6 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

Na análise estatística dos organismos com 6 hpf que receberam os LED's nos tempos de 1, 6 e 12 minutos e depois receberam a dose de DL₅₀, (Figura 36), houve diferença significativa nos grupos: controle e LED 1 minuto, controle e LED 6 minutos, controle e LED 12 minutos, LED 6 minutos e LED 1 minuto, LED 12 minutos e LED 1 minuto.

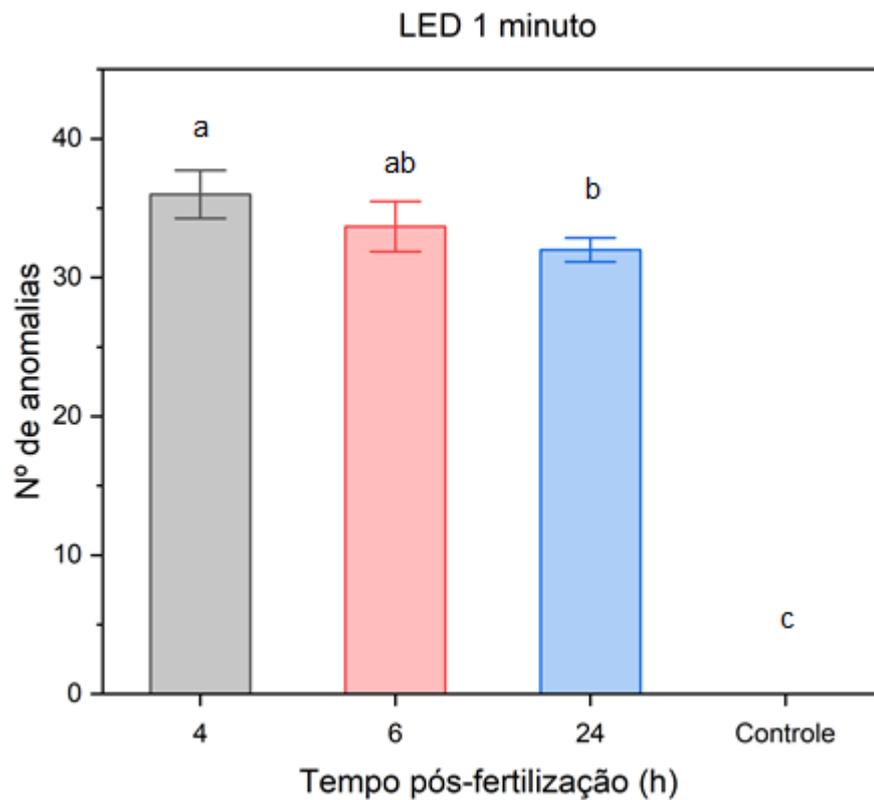
Figura 38 - Valores do número de anomalias de organismos com 24 hpf nos tempos de LED 1 minuto, 6 minutos e 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama.



Fonte: autora da dissertação.

É possível observar na Figura 38 que os organismos de 24 hpf que receberam tempos diferente de LED (1, 6 e 12 minutos) e depois receberam a dose de DL₅₀, em análise estatística os grupos que tiveram diferença significativa foram controle e LED 1 minuto, controle e LED 6 minutos, controle e LED 12 minutos, LED 6 minutos e LED 1 minuto, LED 12 minutos e LED 1 minuto.

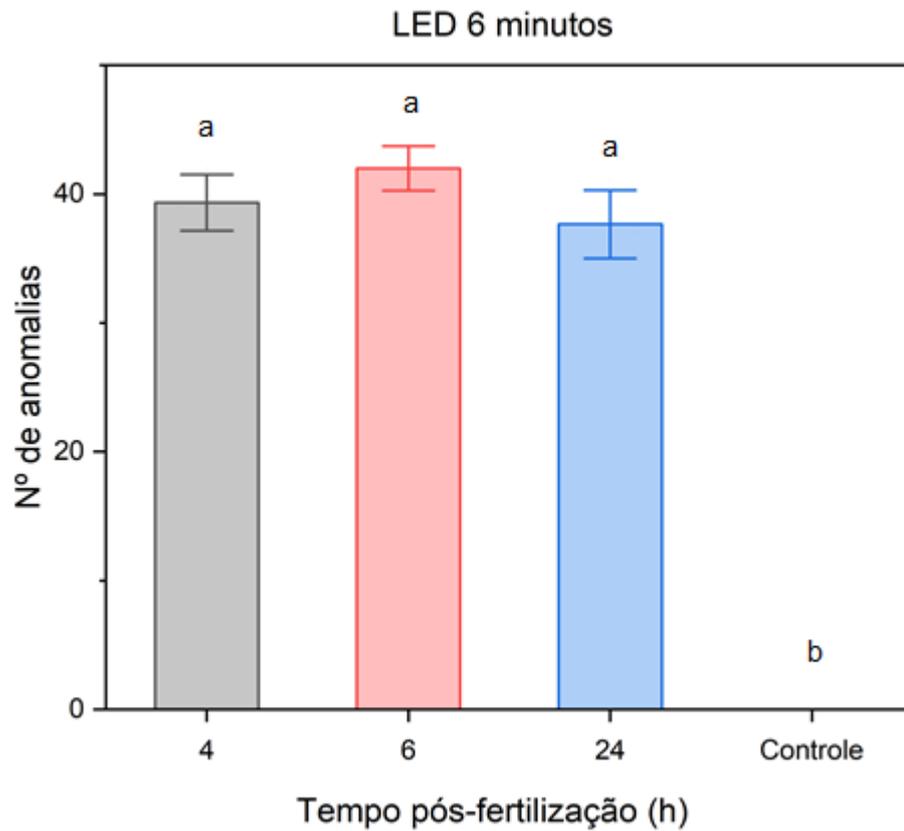
Figura 39 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 1 minuto e a DL₅₀ de radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Os grupos que tiveram diferença significativa na análise estatística foram os seguintes: controle e 4 hpf, controle e 6 hpf, controle e 24 hpf, 24 hpf e 4 hpf, que é possível observar na Figura 39.

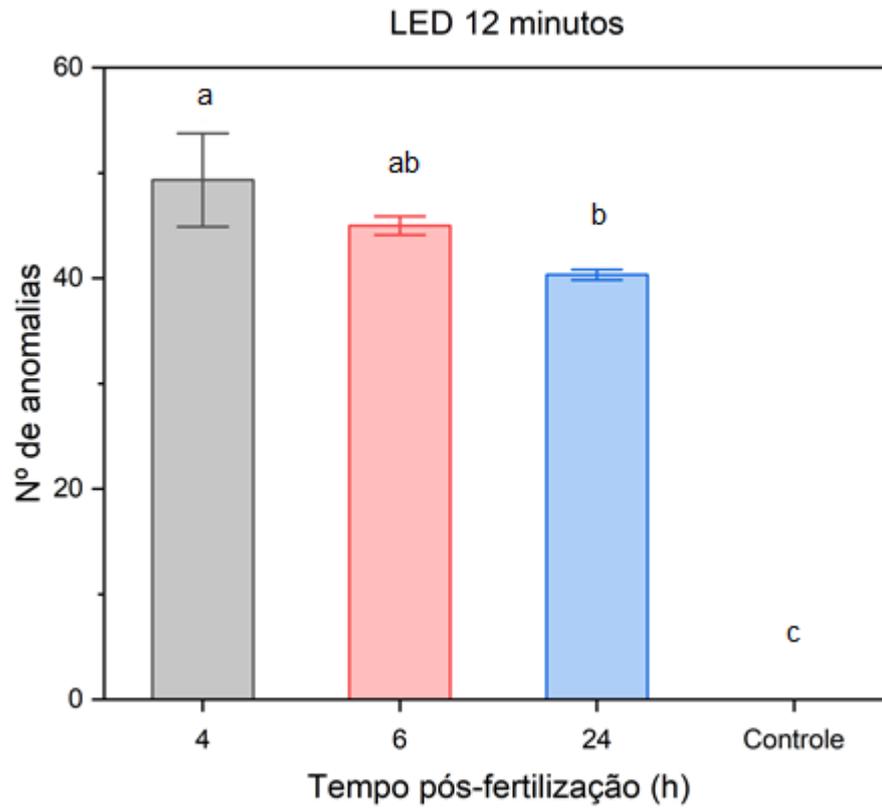
Figura 40 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 6 minutos e a DL_{50} da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.



Fonte: autora da dissertação.

Observa-se na Figura 40 que os grupos que tiveram diferença significativa na análise estatística foram os seguintes: controle e 4 hpf, controle e 6 hpf, controle e 24 hpf.

Figura 41 - Valores do número de anomalias de organismos expostos ao LED 12 minutos e a DL₅₀ da radiação gama em relação ao tempo pós-fertilização.

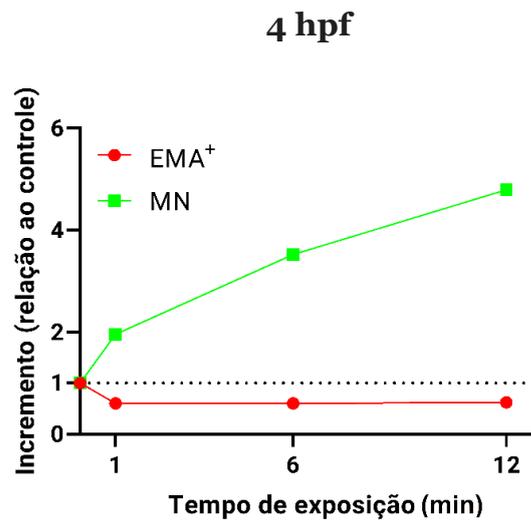


Fonte: autora da dissertação.

Os grupos que tiveram diferença significativa na análise estatística foram os seguintes: controle e 4 hpf, controle e 6 hpf, controle e 24 hpf, 24 hpf e 4 hpf (Figura 41).

5.7 Valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED

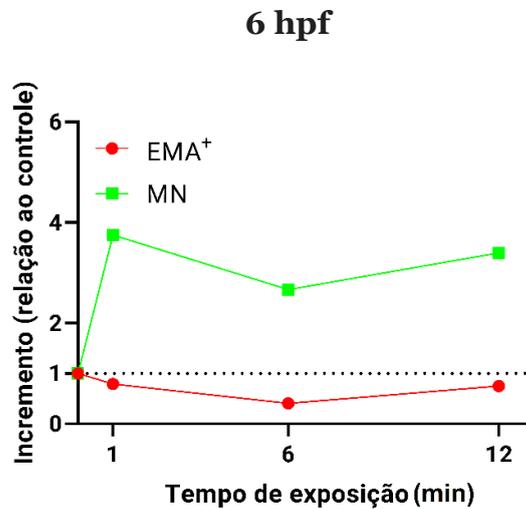
Figura 42 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 4 hpf.



Fonte: autora da dissertação.

Na Figura 42, observa-se que em relação ao controle, a frequência de MN nos tempos de 1, 6 e 12 minutos foi crescente, enquanto a viabilidade celular diminuiu em relação ao controle.

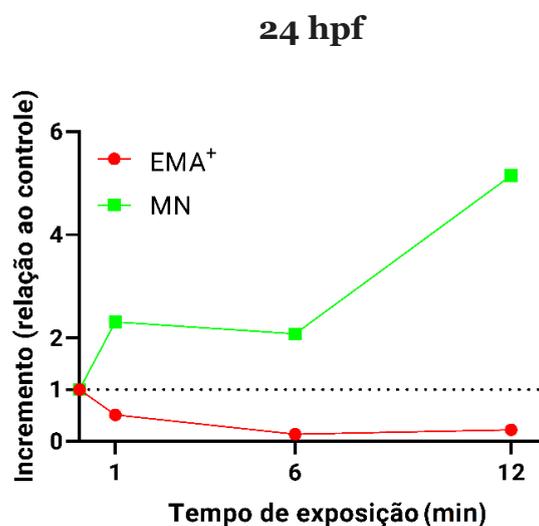
Figura 43 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 6 hpf.



Fonte: autora da dissertação.

Como demonstrado na Figura 43, em relação ao controle, a frequência de MN no tempo de LED 1 minuto, teve um aumento de 4 vezes. O LED 6 minutos teve aumento de 3 vezes e o LED 12 minutos um aumento de aproximadamente de 4 vezes maior, em relação ao controle.

Figura 44 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos com 24 hpf.

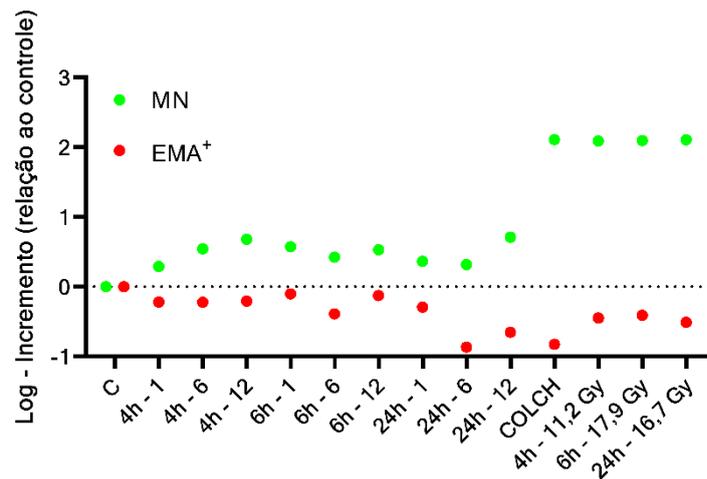


Fonte: autora da dissertação.

Em organismos de 24 hpf (Figura 44), é possível notar um aumento em organismos irradiados com LED 12 minutos, quando comparados ao grupo controle, sendo que nos tempos de LED 1 minuto e LED 6 minutos, o aumento foi menor.

5.8 Comparação dos valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED, DL₅₀ de radiação gama e colchicina

Figura 45 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (0) em escala logarítmica, levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos de organismos, DL₅₀ e colchicina, de todos os tempos pós-fertilização.

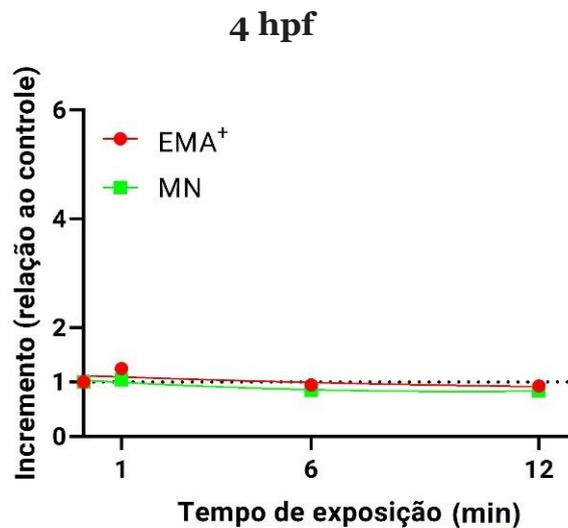


Fonte: autora da dissertação.

Na figura 45, é possível observar a diferença da frequência de MN nos grupos controle, grupos que só receberam LED, grupos que receberam a DL₅₀ de radiação gama e o grupo que recebeu colchicina que induz dano genotóxico. A frequência de micrónúcleos nesses últimos grupos que receberam doses de radiação DL₅₀ e colchicina foram muito maiores quando comparados com os grupos controle e os grupos que receberam apenas LED.

5.9 Valores da frequência de micronúcleos em células de zebrafish irradiados com LED e DL₅₀ da radiação gama

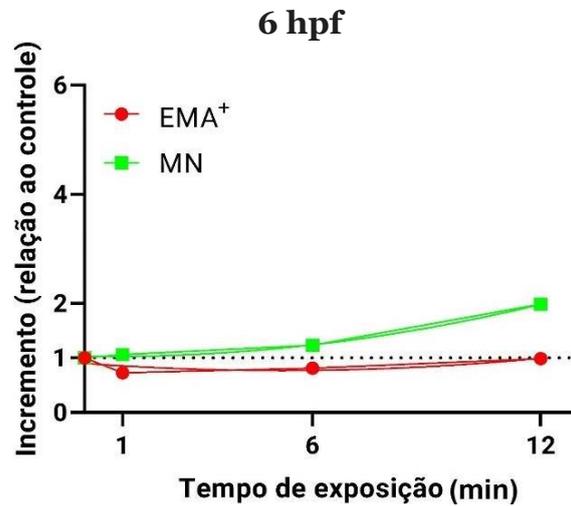
Figura 46 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 4 hpf.



Fonte: autora da dissertação.

A frequência de micronúcleos do grupo controle e dos grupos que receberam o LED e após dose de radiação DL₅₀, (Figura 46), foram similares, tendo uma pequena diminuição decrescente à medida em que o tempo de LED aumentava.

Figura 47 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 6 hpf.

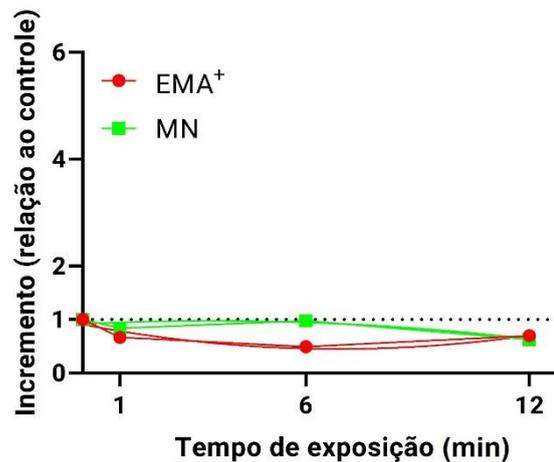


Fonte: autora da dissertação.

Usando o tempo de LED 12 minutos com a DL₅₀ para organismos de 6 hpf, (Figura 47), foi possível notar um aumento de duas vezes quando comparado ao grupo controle, e no grupo LED 6 minutos mais a DL₅₀, houve um aumento de 1,5 vezes.

Figura 48 - Valores da frequência de micronúcleos (MN) e viabilidade celular (EMA+) por incremento em relação ao controle (1), levando em consideração o tempo de exposição ao LED 1, 6 e 12 minutos e posteriormente a dose DL₅₀ de radiação gama em organismos com 24 hpf.

24 hpf



Fonte: autora da dissertação.

Para organismos de 24 hpf (Figura 48), os grupos de LED 1 minuto e LED 6 minutos se manteve o mesmo que o controle, e o grupo LED 12 minutos teve uma quantidade um pouco menor se comparado com todos os outros grupos e controle.

De maneira geral, quando analisamos a quantidade de mortalidade nos indivíduos que receberam apenas o LED, nenhum deles chegaram a 50% de mortalidade, em nenhum tempo utilizado de LED e também em nenhum tempo pós-fertilização do organismo em que foram irradiados, levando em consideração o tempo em que foram analisados os dados e contabilizadas as mortes (144 hpf). Nossos dados obtidos se contrastam com um estudo de 2014, que foi determinada que as larvas de zebrafish que foram expostas a luz vermelha apresentaram 100% de mortalidade após 20 dias de vida, enquanto que com a luz azul, em 30 dpf, houve um aumento significativo na taxa de sobrevivência (VILLAZAMIR, et al., 2014). De acordo com Yuan et. al., (2017) foi

constatado que o crescimento do corpo da larva foi impedido pela luz vermelha e em outro estudo também realizado em 2017, foi descrito que o impacto da luz vermelha induz ao estresse oxidativo, causando inanição e reduzindo a taxa de crescimento do comprimento do corpo (NDANDA et al., 2017). Porém, é importante ressaltar que alguns métodos e condições usados neste presente estudo podem diferir de estudos anteriores, como a intensidade de luz usada, diferenças nas especificações dos LEDs entre outras possíveis diferenças na criação de embriões e larvas de zebrafish, que não são explicadas em detalhes.

Em estudos foi sugerido que as células na fase embrionária do zebrafish são capazes de detectar a luz em 5 hpf (TAMAI et al., 2004) enquanto o órgão pineal detecta a luz por volta dos 24 hpf (KAZINI & CAHILL, 1999). Embora exista a falta de informação concreta sobre a influência de diferentes comprimentos de ondas em fases iniciais no desenvolvimento do zebrafish, alguns estudos utilizando outras espécies de peixe, como robalo, bacalhau (VILLAMIZAR et al., 2011), arinca (DOWNING, 2002) mostraram que o crescimento e desenvolvimento foram aumentados utilizando o comprimento de onda entre 470 a 550 nm (azul-amarelo), havendo divergência com outros estudos. Isto sugere que a resposta de diferentes espécies à luz pode ser distinta, dependendo de como ocorrem mecanismos fotorreceptores, como fotopigmentosa, além da fase de desenvolvimento em que o organismo em questão se encontra (VILLAMIZAR et al., 2014).

O embriões e larvas que receberam apenas radiação gama, tiveram mortalidade e danos significantes, porém quando houve associação do uso do LED e posteriormente o uso de DL_{50} da radiação gama, a maioria dos grupos não atingiram 50% de mortalidade, exceto organismos de 6 hpf, que, quando receberam 6 minutos de LED e posteriormente a DL_{50} de radiação gama, tiveram 58% de mortalidade e organismos com a mesma hora pós-fertilização, quando receberam 12 minutos de LED e posteriormente a DL_{50} de radiação gama, tiveram 68% de mortalidade. Organismos com 6 hpf encontram-se na fase de desenvolvimento conhecida por gastrulação. Neste período a epibolia, que consiste na migração de um conjunto de células que vão recobrir o embrião, e acontecem movimentos celulares morfogênicos de involução, convergência e extensão, o que vai produzir as camadas primárias e o eixo embrionário. Com

os movimentos de involução, a borda da blastoderme vai se dobrar para trás e formar o chamado anel germinativo, que contém duas camadas germinativas: o epiblasto e o hipoblasto. As células do epiblasto dividem-se em direção à margem e as células que chegam à margem movem-se em direção ao interior para integrar o hipoblasto. Diante deste cenário, a literatura nos mostra que dependendo do ciclo celular, a célula não vai apresentar a mesma resposta à radiação e isso acontece pois há diferentes tipos de interação da radiação dependendo da fase em que a célula se encontra. As situações de maior complexidade são as mais vulneráveis às modificações induzidas pela radiação, então quando há células vivendo diferente etapa do ciclo celular, as consequências das interações podem ser diferentes (QUINTANEIRO et al., 2022).

Em relação às anomalias presentes, os indicadores utilizados foram avaliados segundo OECD nº 236 (OECD, 2013), que foram os indicadores de teratogenicidade (escoliose, deformidade do saco vitelínico, malformações no coração e cabeça). A distinção entre a normalidade e não normalidade do desenvolvimento do zebrafish foi descrita por Kimmel et al (1995), em diferentes imagens capturadas dos embriões e larvas em tempos diferentes pós-fertilização. Os grupos irradiados com a luz LED tiveram presença de algumas deformidades nos três tempos de luz utilizados, porém os grupos que mais apresentaram deformidades foram os grupos que receberam apenas a radiação gama, ou LED e radiação gama juntos e é possível observar que os mais sensíveis foram os organismos irradiados com menos tempo pós-fertilização, o que é compatível com o estudo de Geiger et al. (2006) que descreveram que os embriões recém fertilizados parecem mais sensíveis aos efeitos letais da radiação e o desenvolvimento e a suscetibilidade parece diminuir após a fase de gastrulação. As malformações, podem estar associadas a uma resposta diferencial ao estresse (VILLAMIZAR et al., 2014).

Em relação a frequência de micronúcleos os grupos irradiados com LED, tiveram uma frequência maior quando utilizado o LED de 12 minutos nos grupos de 4 hpf e 24 hpf, enquanto com 6 hpf a maior frequência de MN foi na utilização de 1 minuto de LED. O nível basal de MN depende do tipo de célula do peixe-zebra e

dos estágios de desenvolvimento (CANEDO et al., 2021) o que pode indicar a variação da frequência de MN em células de organismos de 6 hpf. As literaturas mostraram uma frequência média de MN em eritrócitos de 0,5%, (WANG et al., 2018; D-COSTA et al., 2018) no cérebro de 1,6%, no fígado de 0,7%, (CANEDO et al., 2021) em ZF-L de 1,1% (BONOMO et al, 2020) nas brânquias de 1%, nos testículos de 0,8% e no ovário de 1,1% (FAßBENDER e BRAUNBECK, 2013). em agregado de células de 3,2% CANEDO et al., 2021). No presente estudo, não foram avaliadas frequência de MN em diversos tipos de células, mas de diversos tipos de células da larva de zebrafish e houve frequência de MN no grupo controle de 2% de MN, aproximadamente. Nos grupos que receberam o LED e após DL_{50} da radiação gama, houve a diminuição da frequência de MN quando comparados com o grupo controle e com os grupos que receberam apenas o LED. É possível verificar a grande diferença na frequência de MN em organismos que receberam apenas a DL_{50} de radiação gama, sem a aplicação prévia do LED. Isso evidencia que o LED protegeu os organismos que receberam radiação gama nos tempos utilizados e na hora pós-fertilização em que eles foram irradiados.

6 CONCLUSÕES

Com os ensaios realizados no presente estudo, foi obtida a DL_{50} da radiação gama em embriões de 4 hpf, 6 hpf e 24 hpf, sendo as doses de 11,2 Gy, 17,9 Gy e 16,7 Gy respectivamente. Levando em consideração que para organismos de 4 hpf e 6 hpf, foi utilizada a DL_{50} de 96 horas de ensaio e para organismos de 24 hpf, a DL_{50} só foi possível de ser obtida com 144 horas de ensaio.

Os resultados obtidos do efeito do LED em organismos irradiados com radiação gama foram positivos, uma vez que os organismos irradiados com a DL_{50} tiveram diminuição da mortalidade quando receberam o LED antes de serem submetidos à radiação gama, com exceção dos organismos de 6 hpf que não foi possível visualizar a diminuição da mortalidade, provavelmente devido a sua fase de desenvolvimento, sendo necessário estudos futuros a fim de avaliar o mecanismo de resposta para estes organismos.

A frequência de MN em organismos irradiados com radiação gama mostraram-se muito maiores que os valores obtidos em organismos irradiados apenas com o LED ou com LED associado à radiação gama. E os organismos que receberam LED e radiação gama posteriormente foram os grupos que tiveram menor frequência de radiação gama, sugerindo o provável efeito radiomodificador protetor que o LED teve em embriões e larvas de zebrafish irradiados com radiação gama, sendo este um resultado relevante para próximas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15088: Ecotoxicidade aquática - Toxicidade Aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae)** Rio de Janeiro: ABNT, 2011.

BEAUVOIT, B.; EVANS, S.M.; JENKINS, T.W.; MILLER, E.E.; CHANCE, B. Correlation between the light scattering and the mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumors. *Anal Biochem*, v. 20, n. 1, p. 74-167, 1995.

BERRA, C. M. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2008.

BONOMO, M.M.; FERNANDES, J.B.; CARLOS, R.M.; FERNANDES, MN. Biochemical and genotoxic biomarkers and cell cycle assessment in the zebrafish liver (ZF-L) cell line exposed to the novel metal-insecticide magnesium-hesperidin complex, *Chemosphere*, v .250, 2020.

BRESCIANI, E.; BROADBRIDGE, E.; LIU, P.P. *An efficient dissociation protocol for generation of single cell suspension from zebrafish embryos and larvae*. v. 5, p. 1287-1290, 2018.

BUMP, A. E.; TAYLOR, C.Y.; BROWN, M. Role Of Glutathione in the hypoxic cell cytotoxicity os misonidazole. *Cancer Resharch*. v. 43, p. 997-1002, 1983.

CANEDO, A.; DE JESUS, L.W.O.; BAILÃO, E.F.C. ROCHA, T.C. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (Danio rerio): Past, present, and future trends, *Environmental Pollution*, v. 290, 2021.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CARTNER, S.; EISEN, J.; FARMER, S.; GUILLEMIN, K.; KENT, M.; SANDERS, G. The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications. **Academic Press**, 2019.

CREASER, W.C. The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time Throughout the Year. **Copeia / JSTOR**, V. 4, P. 159-161, 1934.

CHERKASOVA, O.P.; SERDYUKOV, D.S.; RATUSHNYAK, A.S. *et al.* Effects of Terahertz Radiation on Living Cells: a Review. **Opt. Spectrosc.** v. 128, p. 855–866, 2020.

CHOUERI, P. K. Uso do bagre amarelo (*Cathorops spixii*) como modelo biológico de exposição e efeito de contaminantes no complexo estuarino-lagunar cananéia-Peruíbe. Tese. Universidade Federal do Paraná. 2015

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.Y.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, p. 516-533, 2012.

DAFRE, A. L. Efeitos biológicos da radiação. - 1ª ed. e 2ª reimp. - Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2013. 88p.

DAKUP, P.P.; PORTER, K.I.; GADDAMEEDHI, S. The circadian clock protects against acute radiation-induced dermatitis, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 399, 2020.

DAMASCENO, K. *Avaliação radiomodificadora do resveratrol em embriões de Danio rerio irradiados com radiação gama*. Dissertação de Mestrado. São Paulo: IPEN, 2019.

D'AMORA, M.; GIORDANI, S. A utilidade do Zebrafish como modelo para a triagem de neurotoxicidade no desenvolvimento. **Fronteiras em neurociência**, v. 12, p. 976, 2018.

DAMMSKI, A.P et al. Zebrafish: manual de criação em biotério. Curitiba: Ufpr, 2011. 106 p.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assesment. *Invertebrates. Ecotoxicology*, v. 3, n. 3, p. 161-172, 1994.

D’COSTA, A.H.; SHYAMA, S.K.; PRAVEEN KUMAR, M.K. *et al.* Induction of DNA damage in the peripheral blood of zebrafish (*Danio rerio*) by an agricultural organophosphate pesticide, monocrotophos. *Int Aquat Res*, v. 10, p. 243-251, 2018.

DOURADO, K.B.V.; CARNEVALI, J.L.C.; PAULO, R.J.F.; GOMES, A.C. Ledterapia: Uma Nova Perspectiva Terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparo tecidual. *Ensaio e Ciência: Ciências Agrárias Biológicas e da saúde*, v. 15, n. 16, p.231-248, 2011.

DOWNING, G. Impact of spectral composition on larval haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., growth and survival. *Aqua Res*, v. 33, p. 251-259, 2002.

DUJOVNY, M.; MORENCY, E.; IBE, O.; SOSA, P.; CREMASCHI, F.; DAWOOD, D. Advancer in near infrared light emmiting diode in sport medicine and the role of oxygen spectroscopy, wound healing and inflammation in neuroscience. *Case Rep Surg Invasive Proced*, v. 1, n. 1, p. 13-17, 2017.

ERGENE, S et. al. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 48, n. 6, p. 421-429, 2007.

FAßBENDER, C.; BRAUNBECK, T. Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. *Ecotoxicology*, v. 22, p. 825–837, 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M et. al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. ***Mutagenesis***, v. 26, n. 1, p. 32-125, 2011.

FERRARESI, C.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? ***J Biophotonics***. n.9, v.11, p. 1273-1299, 2016.

FIGUEIREDO, M.A.; CECCON, C.F.; ALMEDA, D.V.; MARINS, L.F. Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene coinjection strategy. ***Genetics and Molecular Biology***, v. 30, n. 1, p. 31-36, 2007.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of zebrafish 4-day embryolarval bioassay to assess toxicity of chemicals. ***Ecotoxicology and environmental safety***. v.63, p. 253-267, 2006.

FUZISSAKI, M.A.; PAIVA, C.E.; OLIVEIRA, M.A.; CANTO, P.P.; PAIVA, M.Y.C. The impact of radiodermatitis on breast cancer patients' quality of life during radiotherapy: a prospective cohort study. ***J Pain Symptom Manage***, v. 58, p. 92-99, 2019.

GAO, Y.; LIU, J.; WANG, X.; LIU, D. Genetic manipulation in zebrafish. ***Chinese Journal of Biotechnology***. v.33, p. 1674-1962, 2017.

GUO, X.; NI, J.; LIANG, Z.; XUE, J.; FENECH, M.F.; WANG, X. The molecular origins and pathophysiological consequences of micronuclei: New insights into an age-old problem, ***Mutation Research/Reviews in Mutation Research***, v. 779, p. 1-35, 2019.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. Fundamentos de física. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HAMA, Y.; TATE, E. Pancytopenia due to massive bone marrow carcinomatosis after radiotherapy for locally advanced breast cancer. *Int Cancer Conf J*, v. 12, p. 52-54, 2019.

HEISKANEN, Vladimir et al. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes?. Photochemical & Photobiological Sciences, *Springer Science and Business Media*, v. 17, n. 8, p. 1003-1017, 2018.

HOFFELDER, D.R. et. al. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma*, v. 112, n. 8, p. 389-397, 2004.

HOWE, K.; CLARK, M.; TORROJA, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, p. 498–503, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Diagnóstico precoce do câncer de boca. Rio de Janeiro: INCA, 2022m. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diagnostico-precoce-do-cancer-de-boca>. Acesso em: 21 ago. 2023.

JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. Syzygium cumini (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. *Toxicology Letters*, v. 132, p. 19–25, 2002.

KARU, T.I. Molecular mechanisms of therapeutic effects of lowintensity laser irradiation, *Laser Life Science*, v.2, p.53-74, 1988.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Photochemistry and Photobiology*. B., v.49, p.1-17, 1999.

KAZIMI, N.; CAHILL, G.M. Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish, *Developmental Brain Research*, v. 117, n. 1, p. 47-52, 1999.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KOLESÁROVÁ, A. Aggregation of k -Order maxitive fuzzy measures. *Int. Jour. of Uncertainty Fuzziness and Knowledge-Based Systems*, v. 6, p. 569-576, 1999.

KUMAR, M.K.P. et al. Effects of gamma radiation on the early developmental stages of Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 142, p. 95-101, 2017.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LAVI, R.; SHAINBERG, A.; FRIEDMANN, H.; SHNEYVAYS, V.; RICKOVER, O.; EICHLER, M.; KAPLAN, D.; LUBART, R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells, *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 17-40, 2003.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Elsevier Science Direct - Aquaculture* v. 269, p. 1–20, 2007.

LAWRENCE C. and HARPER C. The laboratory zebrafish. 1st edition. Florida: 2016.

LEE, J. G.; Cho, H.J.; Jeong, Y.Y.; Lee, J.S. *Approaches Using Zebrafish to Study the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurological Disorders*. Cells. 2021.

LEE, T.H. The design of CMOS radio-frequency integrated circuits, Cambridge University Press, Cambridge, 2003.

LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBER, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity, *Photomedicine and Laser Surgery*, v.23, p. 3-9, 2005.

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Front Genet**, v. 11, n. 4, 2013.

MATTHEWS, M. TREVARROW, B. MATTHEWS J. A virtual tour of the Guide for zebrafish users. **Lab Animal**. v. 31, n. 3, p. 34-40, 2002.

MEDRADES, J. P. Zebrafish: organismo modelo para estudos científicos. **Revista Blog do Profissão Biotec**, v.10, 2023. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/zebrafish-organismo-modelo-para-estudos-cientificos/>>. Acesso em: 25/07/2023.

MEYER, P.F.; ARAÚJO, H.G.; CARVALHO, M.G.F.; BEVERLY, I.S.T.; FERNANDES, I.C.A.G.; RONZIO, O.A.; PINTO, M.V.M. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos wistar. **Fisioterapia Brasil**, v. 11, n.6, p.428-32. 2010.

MCBRIDE, H.M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Curr Biol**, v. 25, n. 14, p. 51-60, 2006.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, v. 399, p. 135–147, 1998

NDANDA, R.B.; KIM, Y.R.; KIM, J.M. *J. Life Scie*, v. 29, n. 7, (2019)

NETO, J.A. Luz de baixa intensidade: lasers de baixa potência e LEDs (light emitting diodes) podem contribuir para a melhora da saúde e qualidade da pele. **International Journal Implant News**, 2023.

NUNEZ, S.C.; SILVA, I.; NASCIMENTO, J.S.; RIBEIRO, M.S. Methodological study of photobiomodulation anti-edematous effects on carrageenan-induced inflammation on zebrafish. **Lasers Med Sci**, v. 35; p. 288–289, 2020.

OECD. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, p. 1-22, 2013.

OECD. *Test No. 487, "in Vitro mammalian cell micronucleus test"*, 2016.

OKUNO, E. *Radiação. Efeitos, riscos e benefícios*. Ed. Harbra, 2007.

PIAU, T.B. Avaliação dos efeitos embriotóxicos, genotóxicos e bioquímicos de larvicidas alternativos da classe das quinonas para o controle do *Aedes aegypti* usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como espécie modelo. 2021. 123 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/42489/1/2021_TathyanaBenetisPiau.pdf> Acesso em: 10/05/2023.

PRYOR, B.; MILLIS, D. L. Therapeutic laser in veterinary medicine. ***Veterinary Clinics: Small Animal Practice***, v. 45, n. 1, p. 45-56, 2015.

QUINTANEIRO, C.; GAGLIARDI, M.; CAPONE, L.; DOMINGUES, I. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. *CAPTAR – Ciência e ambiente para todos*, v. 11, n. 8, p. 1-20, 2022.

RAO, Xiaotang et al. Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. ***Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis***, v. 646, n. 1-2, p. 41-49, 2008.

RIBEIRO, D.H.B.; VIEIRA, E. Avaliação do potencial de impacto dos agrotóxicos no meio ambiente. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/agrotoxicos/index.htm>. Acesso em: 17/10/2023 ROUND, H.J. *The Electrical World* v. 49, p.19, 1907.

SABINO, C.P.; DEANA, A.M.; YOSHIMURA, T.M.; DA SILVA, D.F.; FRANÇA, C.M.; HAMBLIN, M.R.; RIBEIRO, M.S. The optical properties of mouse skin in the visible and near infrared spectral regions. ***J Photochem Photobiol B. Biol***, v. 160, p. 72-78, 2016.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; BRAZ-MOTA S.; DUARTE, R. M.; ALMEIDA-VAL, M. F. Influence of the natural Rio Negro water on the toxicological effects of a crude oil and its chemical dispersion to the Amazonian fish *Colossoma macropomum*. ***Environ Sci Pollut Res***, v .23, p. 19764–19775. 2014.

SADIQUL, I.M. et al. Acute exposure to a quinalphos containing insecticide (convoy) causes genetic damage and nuclear changes in peripheral erythrocytes of silver barb, *Barbonymus gonionotus*. ***Environmental Pollution***, v. 219, p. 949- 956, 2016.

SEPTRIANA, S. KIDDANE, A.T. KIM, DO KIM, G. BROWN, C.L. Effects os diferente wavelenght from Light Emmiting Diodes (LEDs) os growth and development in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. ***EDP Sciences***, 2021.

SCHNEIDER, A.C.R.; DOS SANTOS, J.L.; PORAWSKI, M.; SCHAEFER, P.G.; MAURER, R.L.; MATTE, U.; DA SILVEIRA, T.R. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: zebrafish. ***Revista HCPA***, v. 29, p. 100-103, 2009.

SCHUBERT, E. F. Light Emitting Diodes. 2. ed. Cambridge: Cambridge Univestity Press, 2006.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: RESENDE. R. R. Biotecnologia aplicada à saúde: Fundamentos e aplicações, São Paulo, Ed. Blucher, v.1, p. 1-611, 2015.

SILVEIRA, P. C. L.; SCHEFFER, D. DA L.; et al. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. ***Free Radical Research***, v. 50, n. 5, p. 503–513, 2016.

SILVEIRA, T.R.; SCHNEIDER, C.A.; HAMMES, T.O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. ***Cien. Cult.*** v. 64, n.2, 2012.

SOUZA, C.A. et al. Amifostine (WR-2721), a cytoprotective agent during high-dose cyclophosphamide treatment of non-Hodgkin's lymphomas:a phase II study. ***Brazilian J. Med. Biological Research***. v.33, p.791-798, 2000.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: **Cancer Journal for Clinicians, Hoboken**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SPINELLI, R. G. Higiene ocupacional: agentes biológicos, químicos e físicos. São Paulo: Editora SENAC São Paulo, 2006.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**. v. 291, p. 293-296, 1981.

TAMAI, T.K.; VARDHANABHUTI, V.; FOULKES, N.S.; WHITMORE.; D.A. Early detection of embryonic light improves survival. **Curr Biol**, v. 14, p. 104-105, 2004.

TATA, D.B.; WAYNANT, R.W. Laser therapy: a review of its mechanism of action and potential medical applications. **Laser & Photonics Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2011

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos - 10ª revisão abril/2014 - Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 344p.

UDROIU, I. et al. Micronucleus test on *T. riturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 4, p. 412-417, 2015.

VILLAMIZAR, N.; BLANCO-VIVES, B.; MIGAUD, H.; DAVIE, A.; CARBONI, S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Effects of light during early larval development of some aquacultured teleosts: a review. **Aquaculture**, v. 315, p. 86-94, 2011.

VILLAMIZAR, N.; VERA, L.M.; FOULKES, N.S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. **Zebrafish**, 2014.

VILLAMIZAR, N.; VERA, L.M.; FOULKES, N.S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. **Zebrafish**. v. 11, n. 2, p. 81-173, 2014.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 11- 17, 2011.

WANG, F.; GAO, J.; CHEN, L.; ZHOU, Z.; LIU, D.; WANG, P. Enantioselective bioaccumulation and metabolism of lactofen in zebrafish *Danio rerio* and combined effects with its metabolites, *Chemosphere*, v. 213, p. 443-452, 2018.

YUAN, S.S.; XU, H.Z.; LIU, L.Q.; ZHENG, J.L. *Fish Physiol. Biochem*, 2017.

ZHELUDEV, N. *Nature Photonics* v. 1, n. 4, 2007.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.
