

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

Ana Maria Barbosa

**Efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência no envenenamento induzido pelo veneno
da serpente *Bothrops jararacussu***

**São José dos Campos – SP
2008**

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

Ana Maria Barbosa

**“Efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência no envenenamento induzido pelo
veneno da serpente *Bothrops jararacussu*”**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Prof. Dr. Antonio G. J. Balbin Villaverde

São José dos Campos – SP

2008

B195e

Barbosa, Ana Maria

Efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência no envenenamento induzido pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* /Ana Maria Barbosa. Orientadores Profa. Dra. Stella Regina Zamuner; Prof. Dr. Antonio Guillermo J. Balbin Villaverde São José dos Campos: 2008.

1 Disc Laser.: Color

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1.Venenos de serpentes 2. Envenenamento 3. Terapia a laser de baixa intensidade I. Zamuner, Stella Regina. Orient II. Villaverde, Antonio Guillermo Jose Balbin, Orient.. III. Título

CDU:598.126

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura da aluna: *Ana Maria Barbosa*

Data: 16 de Dezembro de 2008

ANA MARIA BARBOSA

**“EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO ENVENENAMENTO
INDUZIDO PELO VENENO DA SERPENTE BOTHROPS JARARACUSSU”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP) Marcilicia Costa

Prof^ª. Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP) Stella Regina Zamuner

Prof. Dr. **ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVERDE** (UNIVAP) Antonio G. J. Balbin Villaverde

Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO SILVA** (UNINOVE) Carlos Alberto Silva

Prof. Dr. **FRANCISCO OSCAR DE SIQUEIRA FRANCA** (USP) Francisco Oscar de Siqueira Franca

Prof^ª. Dra. **MARIA ALICE CRUZ HÖFLING** (UNICAMP) Maria Alice Cruz Höfling

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretora do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2008.

Ao meu verdadeiro amor, José Ildu de Castro, pela paciência, compreensão e carinho sem medida, durante todos esses anos juntos... Você que sempre acreditou em mim mesmo nas horas mais críticas, especialmente durante o doutorado...

Ao meu irmão Antenor Sérgio Barbosa, o “Déda”, quem eu considero “minha alma gêmea”, por tudo que você me representa... sei que durante toda vida você torceu pelo meu sucesso.

Ao meu sobrinho Guilherme Augusto Barbosa do Prado, por dividir comigo momentos agradáveis em casa, especialmente no final do doutorado.

... a vocês três eu dedico este trabalho.

Agradecimentos especiais

À Deus, pois sem Ele nada teria acontecido em minha vida e esta certamente não teria sentido.

À Professora Dra Stella Regina Zamuner, pela orientação criteriosa e atenção dispensada, mesmo com tantos afazeres, nunca deixou de cumprir sua importante função de orientadora. Além de sua confiança e amizade dispensada a minha pessoa... sem sua orientação essa pesquisa não teria ficado tão interessante! Um exemplo de profissional que batalha e alcança seus objetivos. Sem sombra de dúvidas um espelho pra mim... Minha eterna gratidão.

Ao Professor Dr. Antonio Guillermo Jose Balbin Villaverde por sua orientação, amizade, confiança em mim ao longo deste trabalho, pelas inúmeras horas sentadas ao meu lado me auxiliando no aprendizado sobre laser, além do seu exemplo como profissional. Meus sinceros agradecimentos.

À mestrande Ludmila Guimarães Souza, a “Lud”, pela inigualável colaboração prestada de forma tão carinhosa em toda parte experimental desta pesquisa... razão pela qual sempre a chamei de “meu braço direito”. Por sempre estar de bom humor e com uma disponibilidade de tempo ímpar... Valeu muito Lud.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, pela confiança depositada em mim e ser o responsável pelo meu ingresso na carreira científica. Aprendi muito nesses anos. Sou profundamente grata a você.

Ao Prof. Dr. Wellington Ribeiro pela amizade e total confiança permitido livre acesso em seu laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, além do uso de seus equipamentos. Muitíssimo grata.

À Professora Dra Catarina de Fátima Pereira Teixeira do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (São Paulo), que mais uma vez de forma carinhosa abriu as portas de seu laboratório permitindo o livre acesso para que eu pudesse processar minhas amostras de CK. Mais uma vez muitíssimo obrigada.

A mestra Silvia Fernanda Zamuner e a Dra. Cristina Maria Fernandes do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (São Paulo), pelo valioso apoio nas dosagens do CK. Sem essa colaboração, fatalmente não teria existido os papers da mionecrose e das miotoxinas, e ainda os demais alunos desse laboratório, que sempre me acolheram tão bem... Muitíssimo agradecida.

Ao Dr. Andreimar Martins Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Ribeirão Preto) pela importante colaboração, me fornecendo as miotoxinas, além da leitura do manuscrito, que muito contribuiu para o enriquecimento e conclusão desta pesquisa. Valeu muito sua preciosa colaboração!

Ao professor Dr. Calos José de Lima por ter tão gentilmente me cedido o aparelho de laser. Muito obrigada.

Aos colegas de laboratório Daniela Monteiro, Ticianá Vásquez, Erika Ferrari, Hélio Gouvêa e ao mestre Toni Priante pelo companheirismo indispensável em todos os momentos necessários, e ainda compartilhar do Café de Manhã nas sextas-feiras, foi muito bacana. Valeu...

As bibliotecárias, Rosângela Regis Cavalcanti pela revisão final desta obra e adequação de acordo com as normas da UNIVAP, e Rúbia Gravito Gomes pelo carinho com que sempre me receberam na biblioteca colaborando para a finalização deste trabalho.

Às secretárias Dona Ivone P. Vilela, Dona Neusa Delgado e Valéria Maeda que sempre me receberam com um sorriso e pela disponibilidade de resolver problemas burocráticos.

A todos os professores, funcionários e amigos do IP&D que me ajudaram nos momentos que precisei de apoio e orientação, sou muito grata a vocês.

Ao coordenador do Projeto Social Vale a Pena Viver, o meu amigo Ahed Said Amin, pelo profissionalismo e seriedade com que conduz este grandioso Projeto Social, pelo exemplo de fé em DEUS, pela credibilidade depositada em minha pessoa. Foi um período importante da minha vida, além do grande aprendizado. Muito obrigada.

À Pró-Reitora de Projetos e Ação Social Maria Helena Beolchi Rios Ribeiro, por acreditar na minha capacidade e confiar no meu trabalho. Um dia você me falou: ... que eu moro no seu coração... e isto é recíproco. Agradeço muitíssimo pela grande oportunidade de ter convivido contigo.

À amiga Cássia de Souza, Assistente Social do Projeto Social Vale a Pena Viver, pelo convívio saudável que dividimos juntas nos cursos ministrados nas comunidades de São José dos Campos e cidades vizinhas. Valeu a pena viver estes momentos com certeza...

Aos animais que deram a vida sem direito de escolha.

Agradeço a UNIVAP pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.

Meus sinceros agradecimentos, pela ajuda e apoio de todas aquelas pessoas que de uma forma ou de outra fizeram parte desta minha jornada. Peço desculpas por esquecer talvez de citar alguns nomes, mas todos estes com certeza estão arquivados no meu coração. Sem o carinho de vocês eu certamente não teria atingido meu objetivo.

"A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro."

Albert Einstein.

Efeito da Terapia a Laser de Baixa Potência no envenenamento induzido pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.

RESUMO

No Brasil, os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* representam 90% de todos os acidentes. A serpente *Bothrops jararacussu* causa 0,8 a 10% desses acidentes ofídicos registrados no Brasil. Os venenos botrópicos induzem, de um modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas, como hemorragia, mionecrose, edema e dor. Atualmente, o tratamento preconizado para o acidente ofídico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico que reverte o efeito sistêmico do veneno botrópico, no entanto, a neutralização dos efeitos locais é dificilmente obtida. O laser é um instrumento de grande importância para aplicações na área da saúde, tem ação em processo inflamatório e na reparação tecidual. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da terapia a laser na mionecrose e inflamação induzido pelo veneno da *Bothrops jararacussu* e duas miotoxinas purificadas, desse veneno, a BthTX-I e BthTX-II. Foi utilizado o laser GaAs semiconductor (685 nm, potência 29 mW, tempo 29 s, área 0,2 cm², dose 4,2 J/cm²). Tanto o veneno (0,6 mg/kg) de *Bothrops jararacussu* quanto as miotoxinas I e II (2 mg/kg) foram injetados (i.m.) no músculo gastrocnêmio direito de camundongos. O músculo contralateral foi usado como controle. Os animais que receberam terapia a laser imediatamente e 1 h foram sacrificados com 3 h após a inoculação do veneno. Os animais sacrificados com 24 h receberam laser terapia imediatamente, 1, 3 e 12 h após a inoculação. O antiveneno foi aplicado (i.v.) nos tempos: 30 min antes, imediatamente, 1 e 3 h após a injeção do veneno. A laser terapia foi efetiva na redução do edema nos tempos de 3 e 24 h após a injeção do veneno. Por outro lado o antiveneno aplicado imediatamente à injeção do veneno reduziu o efeito edematogênico em 24 h, mas não em 3 h, quando comparado com a terapia a laser sozinha. O veneno causou migração leucocitária no músculo gastrocnêmio, 24 h após a injeção. A terapia a laser foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos em 24 h. No estudo sobre mionecrose foi observado que as terapias combinadas não foram tão eficazes quanto a terapia a laser sozinha. Ainda, foi investigada a capacidade da terapia a laser em reverter o efeito local como edema, migração leucocitária e mionecrose ocasionada pelas miotoxinas BthTX-I e II. Ambas as miotoxinas causaram efeito edematogênico, infiltrado leucocitário e efeito mionecrótico, 24 h após a injeção. O tratamento com terapia a laser sozinho foi capaz de reduzir o efeito edematogênico, o influxo leucocitário e o dano celular. Foi demonstrado através da análise histológica que a terapia a laser reduz a destruição das fibras musculares. Concluí-se que terapia a laser reduziu significativamente a inflamação e a mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, bem como as miotoxinas BthTX-I e II, podendo vir a ser uma importante ferramenta alternativa no tratamento de acidentados por venenos botrópicos.

Palavras-chave: Veneno botrópico; Inflamação; Mionecrose; Laser terapia.

Effect of Low Power Laser Therapy in envenomation induced by *Bothrops jararacussu* snake venom.

ABSTRACT

In Brazil, the accidents caused by serpents of the *Bothrops* genus represent 90% of all the accidents. *Bothrops jararacussu* venom represents 0.8 a 10% of this envenomation. The botropic venom induces, in a general, a physiopathology picture characterized by immediate local reactions, as hemorrhage, myonecrosis, edema and pain. The most effective treatment for *Bothrops* snakebites accidents is the serum therapy. However, this procedure does not revert efficiently the local manifestation caused by these venoms. The laser is an instrument of great interest and importance for applications in the health area, it has anti edemathogenic and anti-inflammatory action and is used in tissue repair processes. In this way, the objective of this study was to evaluate the effect of the laser therapy in mionecrose and inflammation induced by *Bothrops jararacussu* venom and two myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, isolated by this venom. Laser GaAs semiconductor, was used (685 nm, power 29 mW, time 29 s, area 0.2 cm², dose 4.2 J/cm²). The dose 0.6 mg/kg of *Bothrops jararacussu* venom and doses myotoxins I and II (2 mg/kg) had been injected (i.m.) in the right gastrocnemius muscle, in mice. The contralateral muscle was used as control. The animals that received laser therapy immediately and 1 hour, had been sacrificed with 3 hours after venom inoculation. The animals sacrificed with 24 hours received laser therapy immediately, 1, 3 and 12 h after the inoculation. The antivenom was applied (i.v.) in the different intervals of time: 30 minutes before, immediately, 1 and 3 h after the injection of the venom. The laser therapy was effective in the reduction of edema 3 and 24 h after the injection of the venom. On the other hand, the antivenom applied immediately the injection of the venom reduced the edematogenic effect in 24 h, being inefficient in 3 h, when compared with the laser therapy alone. The venom caused leukocytes influx in the gastrocnemius muscle, 24 h after the injection. The laser therapy was capable to reduce the leukocytes influx in 24 h. In the study on myonecrosis it was observed that the combined therapies had not been efficient as the laser therapy alone. It was demonstrated through the histological analysis that the laser therapy alone was inefficient in preventing the hemorrhagic effect, in contrast the combined treatment (antivenom with the laser therapy) reduced the hemorrhage cause by venom. The capacity of the laser therapy in reduced the local effect caused by BthTX-I and II was investigated. Both myotoxins had caused effect edematogenic, leukocytes infiltration and myonecrotic, 24 h after the injection. The treatment with laser therapy alone was capable to reduce the edemathogenic effect, leukocyte influx and the cellular damage. It was demonstrated through the histological analysis that the laser therapy reduces the damage of muscular fibers. In conclusion, the laser therapy significantly reduced the inflammation and mionecrose induced by *Bothrops jararacussu* venom as well as by myotoxins BthTX-I and II, being able to come to be an important alternative tool in the treatment caused by botropics venoms.

Key-words: Botropic venom; Inflammation; Myonecrosis, Laser therapy

Lista de Figuras

Figura 1. A <i>Bothrops jararacussu</i>	18
Figura 2. Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> no Brasil.....	19
Figura 3. Classificação e características gerais de miotoxinas de venenos ofídicos.	21

Lista de abreviaturas e símbolos

PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
BthTX	Bothropstoxin
IL	Interleucina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IFN	Interferon
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
COX-2	Ciclooxigenase-2
Laser	Ligth Aplification by Stimulated Emision of Radiation
LAP	Laser de Alta Potência
LBP	Laser de Baixa Potência
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
AsGa	Arseneto de Gálio
He-Ne	Hélio-Neonio
i.v.	Intra venoso
i.m.	Intra muscular
μ	Micron
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspecto geral e epidemiológico	14
1.2 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	15
1.3 <i>Bothrops jararacussu</i>	17
1.4 Fosfolipases A2 (PLA2)	20
1.5 Mionecrose	22
1.6 Resposta inflamatória e envenenamento botrópico	23
1.7 Soroterapia	24
2 LASER	27
2.1 Terapia a laser no evenenamento ofídico	30
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos específicos	31
4 RESULTADOS	31
4.1 Effect of low power laser therapy in the inflammatory response induced by <i>Bothrops jararacussu</i> snake venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Ribeiro, W., Cogo J.C., Zamuner, S.R. (2008). <i>Toxicon</i> . 51, 1236-1244.	32
4.2 Effect of low power laser therapy in the myonecrosis induced by <i>Bothrops jararacussu</i> snake venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Ribeiro, W., Cogo J.C., Zamuner, S.R. (2008). <i>Photomedicine and Laser Sugery</i> .	42
4.3 Effect of Low Level Laser Therapy in Inflammatory Response and Myonecrosis Induced by Myotoxins Isolated from <i>Bothrops jararacussu</i> Snake Venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Ribeiro, W., Zamuner, S.F., Cogo, J.C., Zamuner, S.R. (2008). <i>Photochemistry- artigo submetido</i> .	65
5 DISCUSSÃO	97
6 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS	101
Anexo: Certificado do Comitê de Ética	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspecto geral e epidemiológico

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem importante problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo. A incidência e o número de mortes por picada de serpentes, no mundo todo, são desconhecidos, seja por falta de registro ou por metodologia deficiente na captação de dados (LISANO et al., 2003). No entanto, a incidência anual desses acidentes está estimada em 5 milhões, com cerca de 40.000 óbitos (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). Entre 1901 e 2000 foi realizado um extenso levantamento na literatura de casos registrados no Brasil, e conclui-se que as análises realizadas nos últimos 100 anos, são baseadas nas variáveis usadas por Vital Brazil, no início do século passado com todas as mesmas deficiências de subnotificação. Neste século o registro mais recente limita-se a informes regionais (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; PINHO et al., 2004). Um dado importante é que o número de notificações de ofidismo vem aumentando ano a ano, foram registrados em 2003, 25.478 acidentes, correspondendo à incidência de 15 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2005).

As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos na América Latina pertencem ao gênero *Bothrops*, da família *Viperidae*. No Brasil, os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* representam 90% de todos os acidentes, o crotálico (9,2 %), o laquétrico (2,7 %) e o elapídico (0,6 %), com pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográfica das serpentes (BRASIL, 2005).

Historicamente, no Brasil, os primeiros cuidados dispensado por pessoas picadas por serpentes foram promovidos por Vital Brazil, registrando óbitos decorrentes na região de Botucatu no estado de São Paulo. Posteriormente foi desenvolvido um dos maiores centros de criação de serpentes e produção de soro antiofídico, o Instituto Butantan, em 1901 (BENCHIMOL; TEIXEIRA, 1993). A notificação tornou-se obrigatória em 1986, e condicionada a distribuição de soros nos estados (BOCHNER; STRUCHINER, 2002). O tratamento utilizado no caso dos acidentes botrópicos é a soroterapia com antiveneno poliespecífico (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). Os acidentes botrópicos são classificados em leves, moderados ou graves. Esta classificação toma como base as manifestações locais e sistêmicas e auxiliam na definição da dose do soro antitotrópico a ser utilizada. Quando a administração do antiveneno é iniciada imediatamente após a picada, os efeitos sistêmicos do veneno botrópico são normalmente revertidos. Por isso, os coeficientes de letalidade, decorrentes desses acidentes, têm revelado tendência decrescente ao longo do tempo. No entanto, a neutralização dos efeitos locais é dificilmente obtida (GUTIÉRREZ et al., 1981; PICOLO et al., 2002, ZAMUNER et al., 2004). Em decorrência desse fato, as ações locais induzidas pelos venenos botrópicos constituem, atualmente, um alvo de investigação intensa.

1.2 Serpentes do gênero Bothrops

O gênero *Bothrops* é constituído por várias espécies de serpentes que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (HOGE; HOMANO-HOGE, 1978/1979). Apresenta cauda lisa, hábito noturno ou crepuscular. Possui uma enriquecida

coloração com desenhos variados, sobre um fundo que tende a acompanhar a cor, predominante do terreno, variando do verde na *Bothrops Bilineatus*, ao cinza na *Bothrops insularis*. Também muito variável são o tamanho e as denominações, das várias espécies, bem como sua distribuição por toda América Central e do Sul, incluindo território brasileiro (BARRAVIERA, 1997). Habitam preferencialmente zonas rurais, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja proliferação de roedores (paióis, depósitos de lenha e celeiros), sua base alimentar (MELGAREJO, 2003). As serpentes do gênero *Bothrops* são consideradas as mais agressivas (BORGES, 2001), sendo responsáveis por 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais ocorridos no Brasil (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003), não apresentam alta letalidade (0,31 %), porém devido à alta incidência, são consideradas de grande importância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). Os venenos de serpentes botrópicas induzem, de um modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizados por reações locais imediatas, como hemorragia, mionecrose, edema e dor (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; PICOLO et al., 2002; BARBOSA et al., 2003; ZAMUNER et al., 2004; MAIORANO et al., 2005; TICLI et al., 2005), além dos efeitos sistêmicos, como alteração da coagulação sangüínea, do sistema cardiovascular, levando ao choque, bem como a insuficiência renal aguda (GUTIÉRREZ et al., 1981; AMARAL et al., 1985; BARRAVIERA, 1997).

O veneno ofídico tem sido alvo de estudos em diversas áreas da ciência, devido à presença de compostos biologicamente ativos (toxinas) que são sintetizados e estocados em glândulas. O isolamento e a caracterização funcional e estrutural dessas toxinas têm auxiliado na compreensão de diversos sistemas biológicos e no mecanismo de ação dos venenos. Alguns dos elementos protéicos atuam enzimaticamente, enquanto outros agem como toxinas diretas, principalmente na desestabilização de membranas celulares pelos

mecanismos mais variados. O veneno da serpente do gênero *Bothrops* é, provavelmente, de composição mais complexa dentre as de outros gêneros. Seu veneno apresenta inúmeras frações proteicas, cujo mecanismo de ação ainda não está bem definido. O componente não protéico do veneno botrópico é pouco expressivo em quantidade e menos ativo biologicamente, porém, desempenha importante papel coadjuvante na ação enzimática. Dentre os componentes não protéicos se encontram substâncias inorgânicas e orgânicas. Foi detectado cerca de 70 peptídeos em um único veneno (PERKINS et al., 1993).

1.3 Bothrops jararacussu

A serpente *Bothrops jararacussu* é conhecida na língua indígena, como “jararaca grande” por possuir grande quantidade de veneno, e popularmente como jararacussu. Pertence à classe *Reptilla*, ordem *Squamata*, família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae* e com nome científico de *Bothrops jararacussu*. Diferencia-se das jararacas comuns pelo porte, padrão de desenho em seu corpo e por possuir a parte superior da cabeça negra (MILANI JUNIOR et al., 1997). Em geral é facilmente reconhecida, dado o grande porte e colorido das fêmeas, muito mais comuns que os machos na natureza. A serpente adulta pode atingir de 1,5 a 2,20 m e com 22 cm de circunferência. Há um acentuado dimorfismo sexuais entre machos e fêmeas, sendo estas marcadamente amarelas e pretas, enquanto que os machos são marrons e pretos, além de consideravelmente menores e mais delgados. Essas características fazem com que seja inconfundível. Apresenta hábitos noturnos ou

crepusculares, podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, deferindo botes sem produzir ruído.



Figura 1. A *Bothrops jararacussu*.

Fonte: www.univap.br/cen/bothrops_serpentario.php.

Sua distribuição geográfica ocorre na América do Sul, habitando a mata Atlântica. Ocorrem no Brasil, Paraguai, Bolívia e norte da Argentina. No Brasil, a espécie *Bothrops jararacussu* é predominante encontrada na região do Mato Grosso, extremo sul da Bahia, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e noroeste do Rio Grande do Sul (CAMPBELL; LAMAR, 1989; MELGAREJO, 2003).



Figura 2. Distribuição geográfica da serpente *Bothrops jararacussu* no Brasil.

O envenenamento causado por *Bothrops jararacussu* tem grande mortalidade quando comparada com outras serpentes do mesmo gênero e com *Crotaluss durissus terrificus* (SANCHEZ et al., 1992), sendo responsável por 0,8 a 10% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (MILANI JUNIOR et al., 1997). O grande nível de letalidade, esta atribuída aos 30% de miotoxinas encontradas no veneno total (RODRIGUES-SIMIONI et al., 1983; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), e componentes hemorrágicos (QUEIROZ et al., 1984; da SILVA et al., 2007; MARCUSSI et al., 2007).

Para entender melhor a gravidade do acidente causado por *Bothrops jararacussu*, Milani Junior et al., (1997) fizeram um estudo clínico–patológico em 29 casos, atendidos num período de 20 anos, em dois hospitais do estado de São Paulo. Foram encontrados sinais de necrose local, abscessos, coagulopatia, choque, necrose tubular renal e morte. Este estudo mostrou a importância e gravidade dos acidentes causados pela serpente

Bothrops jararacussu. Embora a literatura registre poucos casos de hemorragia intracerebral após picada de serpente do gênero *Bothrops*, Pinho e Burdmann (2001) relataram um acidente por *Bothrops jararacussu* apresentando múltiplas manifestações de coagulopatia, falência renal aguda e um forte quadro clínico, sugerindo hemorragia cerebral. Ainda, Bevenuti et al., (2003) relataram outro acidente por *Bothrops jararacussu*, com sinais locais do envenenamento apresentando hemorragia, trombose e necrose do tecido muscular, com morte do paciente 45 minutos após a chegada ao hospital. Esses autores sugerem que a hemorragia pulmonar causada pela ação secundária das hemorraginas tenha sido a causa provável de morte rápida. Além disso, Amaral et al., (1985) observaram necrose no córtex renal em indivíduos picados por *Bothrops jararacussu*.

1.4 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂), (fosfatidil-acil-hidrolases; EC 3.1.1.4) são enzimas que hidrolisam a ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídios, liberando ácidos graxos livres e fosfolipídios (KINI et al., 2003). Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (DENNIS, 1994). As fosfolipases intracelulares estão freqüentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolipídios e outras funções celulares (MUKHEERJEE et al., 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e nos venenos de serpentes e artrópodes.

As PLA₂ presentes no veneno de serpentes podem ser classificadas em grupos baseadas na sua estrutura primária e no modelo de pontes de dissulfeto (BALSINDE et al.,

1999; SIX et al., 2000). Mais especificamente, as PLA₂ miotóxicas encontradas em veneno botrópico podem ser subdivididas em dois grupos Asp-49 cataliticamente ativos e Lys-49 com baixa ou nenhuma atividade catalítica, como mostrada na fig. 3.

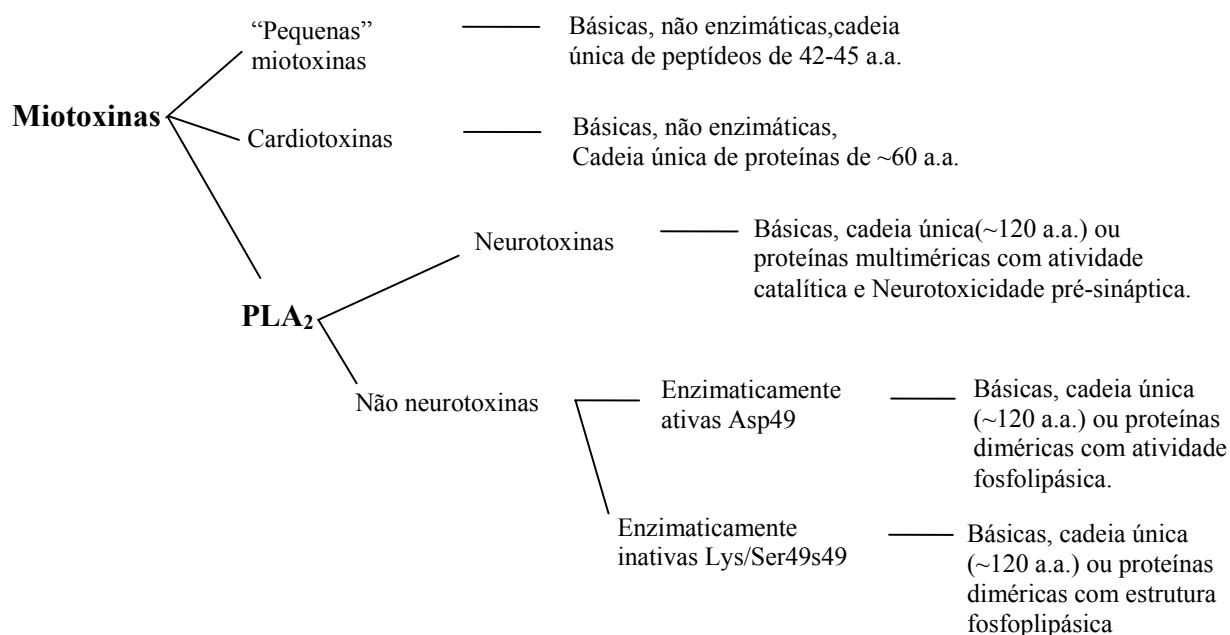


Figura 3. Classificação e características gerais de miotoxinas de venenos ofídicos.

Fonte: Lomonte et al. (2003).

As PLA₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*, geralmente, possuem um resíduo aspartato na posição 49 (Asp49) altamente envolvido com o sítio de ligação ao Ca²⁺. Porém, em algumas dessas enzimas, o resíduo aspartato é substituído nesta posição pela lisina (Lys49), o que impede a ligação ao Ca²⁺ (VAN DER BERGH et al., 1989), tornando a enzima cataliticamente inativa, embora ambos os tipos sejam biologicamente ativos (LOMONTE et al., 2003). Além disso, pelo menos duas variantes com resíduo de serina ocupando a posição 49 (PLA₂ Ser49) foram descritas (POLGÁR et al., 1996).

Foram purificadas, do veneno de *Bothrops jararacussu*, as miotoxinas Bothropstoxin I (BthTX-I), uma Lys 49 básica, principal mitoxina com grande peso molecular, ponto isoelétrico mostrando similaridade na sua composição aminoácido (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988) e Bothropstoxin II (BthTX-II), Asp 49 básica (ANDRIÃO-ESCARSO, et al., 2000). Desde que foram isoladas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* a BthTX-I e a BthTX-II tem sido extensivamente investigadas. A BthTX-I pode ser considerada um modelo molecular que apresenta desafios, porque possui miotoxicidade elevada, e, no entanto não têm nenhuma atividade PLA₂. Porém, apesar de sua atividade catalítica baixa, a BthTX-I induz mionecrose extensiva (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; FLETCHER et al., 1996; OWNBY et al., 1999) e, ainda diversos efeitos farmacológicos que incluem o edema, desgranulação do mastócito, bloqueio irreversível da contração do músculo, interrupção de lipossoma e a citotoxicidade em células endoteliais (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; LANDUCCI et al., 1998). Apesar de a BthTX I ser destituída da atividade de PLA₂, foi capaz de bloquear a transmissão neuromuscular em preparação de nervo frênico diafragma (OSHIMA-FRANCO et al., 2001).

1.5 Mionecrose

Durante muitos anos houve um grande interesse em se estudar componentes do veneno que são responsáveis pela mionecrose, resultando no isolamento e caracterização estrutural e funcional de várias PLA₂ miotóxicas de venenos do gênero *Bothrops* (OWNBY et al., 1999; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; COGO et al., 2006).

As miotoxinas exercem uma ação direta sobre o músculo esquelético causando rompimento de membrana plasmática e hipercontração das miofibrilas, seguida da dissolução dos componentes celulares, levando à degeneração e morte celular denominada mionecrose (CALIL-ELIAS et al., 2002; DOURADO et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005, GUTIÉRREZ et al., 2008). Histologicamente, a mionecrose causada por venenos botrópicos é comprovada por um aumento na permeabilidade da fibra muscular, danos no sarcolema e acúmulo da enzima creatina kinase (MEBS et al., 1983).

1.6 Resposta inflamatória e envenenamento botrópico

Os eventos fisiopatológicos produzidos pelo envenenamento botrópico, tem como característica a presença de efeitos locais, como o processo inflamatório. O efeito edematogênico ocasionado pelos venenos botrópicos, até o momento, não foi atribuída a nenhuma proteína isolada, por se tratar, possivelmente, da somatória de efeitos de várias toxinas presentes nesses venenos. Estudos experimentais mostram evidências quanto à participação de toxinas hemorrágicas (RODRIGUES et al., 2001), fosfolipases A₂ (PONCE-SOTO et al., 2007), proteases, componentes dos venenos que causam a liberação de histamina de mastócitos e substâncias que ativam o sistema complemento (GUTIERREZ; LOMONTE, 1989; DIAS DA SILVA et al., 1995). Outros autores demonstraram que o edema induzido pelos venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e *Bothrops insularis* ocorre devido a ação de mediadores α e β -adrenérgicos, eicosanóides, fator ativador de plaquetas (PAF), além de serotonina e histamina (TREBIEN; CALIXTO 1989, CHAVES et al., 1995; BARBOSA et al., 2003; OLIVO et al., 2007). Após o efeito edematogênico, o próximo evento local induzido pelo

acidente botrópico é a migração leucocitária. Os leucócitos desempenham importante papel no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória. Neste sentido, foi observado o acúmulo de leucócitos no local da injeção experimental do veneno de *Bothrops jararaca* em ratos (FARSKY et al., 1997), migração de neutrófilos induzida pela administração de venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops alternatus* na cavidade peritoneal de ratos (FLORES et al., 1993). No músculo gastrocnêmio de ratos foi mostrado um infiltrado leucocitário, composto principalmente de neutrófilos após a injeção do veneno de *B. jararaca* da Argentina (ACOSTA DE PÉREZ et al., 1996). Ainda, a literatura mostra um aumento de citocinas inflamatórias, como a IL-1, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ , no soro e no local da injeção de animais inoculados com venenos de serpentes de várias espécies do gênero *Bothrops* (ZAMUNER et al., 2001; CHAVES et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que os venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* induzem a liberação de PGE₂ e PGD₂ e que essa liberação ocorre devido a um aumento da expressão de COX-2 (MOREIRA et al., 2007; OLIVO et al., 2007).

1.7 Soroterapia

O tratamento preconizado para o acidente botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico. No Brasil, a produção de antivenenos é feita pelo Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e Fundação Ezequiel Dias (MG), sendo distribuído para todo o país pelo Ministério da Saúde (SCHVARSTSMAN, 1992; CAMEY et al., 2002). A soroterapia antiveneno, quando indicada, é um passo fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais

peçonhentos. A dose utilizada deve ser a mesma para crianças e adultos, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante, independente do peso do paciente e cada paciente recebe uma quantidade de antiveneno conforme a gravidade de cada caso (CARDOSO et al., 1993). A sua aplicação deve ser preferencialmente em postos de atendimento médico (MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2001).

Quando a administração do antiveneno é iniciada imediatamente após a picada, os efeitos sistêmicos do veneno botrópico são normalmente revertidos. Devido a eficiência dos antivenenos, os coeficientes de letalidade, decorrentes desses acidentes, têm revelado tendência decrescente ao longo do tempo. Em contraste, a neutralização dos efeitos locais é dificilmente obtida. Embora a soroterapia, seja a única abordagem terapêutica geralmente usada para tratar acidentes ofídicos, este tratamento pode acarretar algumas reações indesejáveis como: reações tipo anafiláticas, que podem ser definidas como choque sistêmico onde ocorrem secundariamente à introdução de substâncias estranhas ao organismo. Essas reações são observadas nos indivíduos que anteriormente receberam o soro de cavalo, e apresentaram antecedentes de alergias. Do ponto de vista clínico, pode-se observar exantema, reação urticariforme, espasmo brônquico, edema de glote, choque periférico e, se não tratado imediatamente, leva à morte; e doença do soro, caracterizada pela febre, erupção urticariforme, dores articulares e musculares, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e proteinúria (CARDOSO et al., 1993; DART; HOROWITZ, 1996; OTERO-PATIÑO et al., 1998).

Os estudos experimentais tem sugerido que existe uma significante, embora parcial, neutralização da hemorragia, edema e mionecrose apenas quando o antiveneno é

administrado rapidamente após o envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 1981/1998). Neste sentido, Camey et al. (2002) estudaram o efeito farmacológico do veneno de cinco espécies botrópicas brasileiras em relação à sua letalidade e atividades hemorrágica, necrosante, proteolítica da fosfolipase, coagulante e fibrinolítica. Analisaram também *in vitro* e *in vivo* a eficácia do antiveneno produzido a partir de um "pool" desses venenos em neutralizar a atividade tóxica e enzimática dos mesmos. Os resultados indicaram que o antiveneno foi efetivo na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. Porém, os efeitos locais não são neutralizados pelo uso de antiveneno. Ainda, Battellino et al. (2003) mostraram que a administração intravenosa do antiveneno botrópico neutraliza os efeitos sistêmicos, mas não reverte efetivamente o sintoma local produzido pelo veneno de *Bothrops jararaca* e, os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, não tem sido esclarecidos.

No tratamento do envenenamento com a *Bothrops jararacussu*, o antiveneno polivalente botrópico é frequentemente administrado em grandes quantidades, mas não tem se mostrado efetivo, apesar do fato dos três fabricantes de antiveneno no Brasil usarem o veneno de *Bothrops jararacussu* na sua composição (THEAKSTON et al., 1991). Neste sentido, Vital Brazil (1911) considerou que o antiveneno crotálico era mais efetivo que o antiveneno botrópico para o tratamento dos pacientes envenenados pela *Bothrops jararacussu*. Mais recentemente, Dias da Silva et al. (1989) mostraram que o veneno de *Bothrops jararacussu* era menos antigênico que outros venenos botrópicos e a sua atividade letal foi inadequadamente neutralizada por antiveneno botrópico monovalente ou polivalente. Além disso, Dos Santos et al. (1992) mostraram, experimentalmente, que a combinação dos antivenenos botrópico e crotálico foi mais eficiente em neutralizar a

letalidade, miotoxicidade e atividade coagulante do veneno de *Bothrops jararacussu* do que apenas o antiveneno botrópico.

Por todas essas complicações apresentadas com a administração do soro antibotrópico, algumas alternativas têm sido propostas como coadjuvante da soroterapia, algumas baseadas na utilização de anticorpos humanos recombinantes, já que vem sendo empregada com sucesso nos tratamentos de tumores, rejeição de transplantes, artrites reumatóides e alergias (HOOLIGER; HOOGENBOOM, 1998), sugerindo que sua utilização também seja possível no tratamento de acidentes ofídicos (CARDOSO et al., 1993). Entretanto, qualquer que seja a abordagem terapêutica até hoje disponível, esta tem se mostrado ineficaz na neutralização dos efeitos locais produzidos pela picada e liberação do veneno no sítio, as quais são de evolução rápida e intensa. Por esses motivos a procura por abordagens alternativas às usualmente empregadas, tem sido motivo de interesse e se constituem em medidas extremamente relevantes para neutralização e/ou diminuição dos efeitos degenerativos, bem como a aceleração do processo regenerativo. No Brasil, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia. Já existe, embora ainda que incipiente, estudos que combinam o uso da soroterapia à aplicação de extratos de plantas medicinais (BIONDO et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2007). Outra possibilidade que começa a ser implementada é a utilização da laser terapia.

2 LASER

Há muitos anos a luz é utilizada como tratamento fototerápico. A luz solar foi empregada como helioterapia na Grécia antiga, onde os pacientes ficavam expostos à luz do sol para restauração da saúde (BASFOR, 1995). Desde então, o emprego da luz tem sido motivo de interesse científico em diversas modalidades de diagnóstico e tratamentos de doenças. A luz laser é uma fonte de radiação não-ionizante, altamente concentrada, que, em contato com diferentes tecidos, resulta com o tipo de laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos. A palavra Laser é um acrônimo para “Ligth Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação” e designa uma série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética em diversas faixas do espectro eletromagnético, desde o raio X até o infravermelho. Seu meio ativo resulta em luz laser de comprimento de onda específico e cada comprimento reage de uma maneira diferente com cada tipo de tecido. As características peculiares de cada tecido, principalmente as que controlam reações moleculares bioquímicas devem ser observadas. Geralmente a extensão da interação entre lasers e os tecidos é determinado pelo comprimento de onda da luz laser e pelas características ópticas de cada tecido (PINHEIRO, 1998).

O uso do laser começou com a invenção do laser de rubi em 1960. Em seus diversos tipos, tem se mostrado um auxiliar tão importante, que várias pesquisas de suas possíveis aplicações estão sendo realizadas nos mais diversos pontos do mundo nas últimas décadas, inclusive nas áreas médicas e paramédicas. A possibilidade de focalização em pequenas áreas e a emissão de altas densidades de energia, faz do laser um instrumento de grande

interesse e importancia para aplicações na área da saúde, tanto no diagnóstico como na terapia.

O laser pode ser classificado em: cirúrgico de alta potência, laser de alta potência (LAP) e não cirúrgico de baixa potência (LBP). A terapia com LBP ocorre por meio de reações atômicas da luz com o tecido ocasionando efeitos fotoquímicos (HONMURA, et al., 1993; SCHAFFER et al., 2000). São utilizados em processos de reparação tecidual. O principal efeito gerado nos tecidos tem natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização (LOPES; BRUGNERA, 1998).

A terapia com LBP age principalmente sobre as organelas celulares (membranas de mitocôndrias), gerando aumento de ATP (Trifosfato de Adenosina) e modificando o transporte iônico (KARU, 1987/1989). Um interesse considerável pelos efeitos do LBP na biomodulação tecidual e metabolismo celular tem surgido nas últimas décadas, onde numerosos estudos foram publicados avaliando aspectos variados dos efeitos do LBP em sistemas biológicos, como na produção de matriz extracelular, atenuação da dor, remodelamento de restauração óssea, reparação de tecidos e funções imunes das células (WALSH, 1997). A irradiação laser promove um aumento na produção de ATP intracelular; favorece a produção de ácido aracdônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, justificando sua ação antiedematosa e antiinflamatória (ALBERTINI et al., 2004/2007), promove aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando o efeito analgésico na dor não inflamatória (PETRACHI, et al., 1990; FERREIRA et al., 2005), atividade proliferativa das células e em processos de reparação tecidual. (NOMURA et al., 2001; RABELO et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004).

2.1 Terapia a laser no evenenamento ofídico

Até o presente momento, apenas dois trabalhos foram publicados utilizando o laser de baixa potência para tratamento causado por veneno ofídico. Dourado et al. (2003), estudaram o efeito da irradiação laser Ga-As ($4\text{J}/\text{cm}^2$), em mionecrose no músculo gastrocnêmio de camundongo causado pela injeção intramuscular de veneno total da serpente *Bothrops moojeni* e, ainda, Doin-Silva et al. (2008) utilizaram em seus estudos o laser He-Ne ($3,5\text{J}/\text{cm}^2$) para tratar a mionecrose no músculo tibial anterior de ratos causada pelo veneno total da serpente *Bothrops jararacussu*. Esses autores observaram que o tratamento com ambos os lasers foram capazes de reduzir o índice de mionecrose, inibindo a habilidade dos venenos de desfazer a integridade da membrana plasmática. Até o momento, não há na literatura estudos mostrando o efeito da terapia laser em reduzir o processo inflamatório local causado por envenenamento botrópico. Embora haja escasses na literatura sobre o uso de laser a terapia em tratamentos de acidentes ofídicos, o uso desta ferramenta pode ser mais uma alternativa eficiente na solução para neutralizar os efeitos locais no tratamento de envenenamentos ofídicos ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*. Dessa maneira, estudos voltados para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos no efeito da terapia laser de baixa potência sobre a mionecrose e inflamação induzidos por venenos do gênero *Bothrops* se revestem de importância.

3 OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo estudar *in vivo* os efeitos da terapia laser de baixa potência AsGa na resposta inflamatória e efeito mionecrótico induzidos pelo veneno total da serpente *Bothrops jararacussu*, bem como sua neutralização por antiveneno botrópico.

3.1 *Objetivos específicos*

Foram avaliados os efeitos da injeção intramuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* ou das miotoxinas isoladas BthTX-I e BthTX-II, bem como a ação da terapia a laser, quanto:

- Ao nível de creatina kinase liberada no músculo gatrocnêmio;
- À formação de edema no músculo;
- A migração leucocitária para o músculo;
- A ação da terapia a laser sozinha ou combinada com a soroterapia.

4 RESULTADOS

4.1 Effect of low power laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops jararacussu snake venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Ribeiro, W., Cogo J.C., Zamuner, S.R. (2008). Toxicon. 51, 1236-1244.

4.2 Effect of low power laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Ribeiro, W., Cogo J.C., Zamuner, S.R. (2008). Photomedicine and Laser Surgery.

4.3 Effect of Low Level Laser Therapy in Inflammatory Response and Myonecrosis Induced by Myotoxins Isolated from Bothrops jararacussu Snake Venom. Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Ribeiro, W., Zamuner, S.F., Cogo, J.C., Zamuner, S.R. (2008). Photochemistry - artigo submetido.

**EFFECT OF LOW LEVEL LASER THERAPY IN INFLAMMATORY RESPONSE
AND MYONECROSIS INDUCED BY BthTX-I AND BthTX-II MYOTOXINS
ISOLATED FROM *BOTHROPS JARARACUSSU* SNAKE VENOM.**

Ana Maria Barbosa^a, Antonio Balbin Villaverde^b, Ludmila Guimarães-Sousa^a, Andreimar M. Soares^d, Silvia Fernanda Zamuner^e, José Carlos Cogo^c and Stella Regina Zamuner^{a,*}

^aLaboratory of Inflammation, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-000, São José dos Campos, SP, Brazil.

^bLaboratory of Biomedic Instrumentation, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba, Brazil.

^cLaboratory of Physiology, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba, Brazil.

^dDepartamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

^eLaboratory of Pharmacology, Butantan Institute, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil.

Short Title: Effect of LLLT in the Myonecrosis and Inflammation Induced by myotoxins.

Corresponding author:

Stella Regina Zamuner, PhD

Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12220-000, São José dos Campos, SP, Brasil.

Phone: 55-12-3947-1106

E-mail: szamuner@univap.br

Abstract

The prominent myotoxic effect induced by *Bothrops jararacussu* crude venom is due, in part, to its polycationic myotoxins, BthTX I and BthTX II. Both myotoxins have phospholipase A₂ structure: BthTX II is an active enzyme Asp-49 PLA₂, while BthTX I is a Lys-49 PLA₂ devoid of enzymatic activity. In this study, the effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) on edema formation, leukocyte influx and myonecrosis caused by BthTX-I and BthTX-II, isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom, was analyzed. BthTX-I and BthTX-II caused a significant edema formation, a prominent leukocyte infiltrate composed predominantly by neutrophils and myonecrosis at 24 h in envenomed gastrocnemius muscle. LLLT significantly reduced the edema formation, neutrophil accumulation and myonecrosis induce by the BthTX-I and II, at 24 h. The use of LLLT induces a reduction by: 41.02 % and 60.74 % on the edema formation, 57,5 % and 51,6 % of the leukocyte influx and 60% and 43% for the myonecrosis, caused by BthTX I and BthTX II envenomation, respectively. In conclusion, LLLT significantly reduced the effect of BthTX I and BthTX II on the inflammatory response and myonecrosis. Results suggest that LLLT should be considered as a potentially therapeutical approach for treatment of local effects of *Bothrops* species.

Key words: *Bothrops jararacussu*, myotoxins; inflammation; LLLT.

Introduction

Venom phospholipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) catalyze the hydrolysis of the *sn*-2-acyl bond of glycerophospholipids in a calcium-dependent fashion to release free fatty acids and lysophospholipids. These reaction products may exert biological activities directly or may be transformed into other active compounds (Dennis, 1994; Dessen, 2000) with haemostatic, cardiotoxic, convulsant, hemolytic, hypotensive, myotoxic and neurotoxic activities (Kini, 2003; Fuly et al., 2004).

Numerous experimental studies have shown that *Bothrops* PLA₂s are involved in venom-induced inflammatory responses such as edema, pain, leukocyte migration (Teixeira et al., 2003; Ticli, 2005) and necrosis (Harris, 2000; Gutiérrez and Ownby, 2003; Ticli, 2005; Rodrigues, 2007). *Bothrops* PLA₂s exist as monomers of ~14 kDa or as homodimers of ~28 kDa, and may be classified as Asp49 or Lys49 PLA₂, depending on the residue at the position 49 in the amino acid sequence (Gutiérrez and Lomonte, 1995; Lomonte et al., 2003). PLA₂s with Asp49 are enzymatically active whereas Lys49 PLA₂s have little or no enzyme activity, although both types are biologically active (Lomonte et al., 2003). Two myotoxins had been isolated from *Bothrops jararacussu* venom, Bothropstoxin I (BthTX-I), basic Lys 49, major myotoxin (Homsí-Brandeburgo et al., 1988) and Bothropstoxin II (BthTX-II), basic Asp 49 (Andrião-Escarso, et al., 2000). These proteins play a relevant role in the pathogenesis of local tissue damage induced by *Bothrops jararacussu* venom, causing myotoxic and edema-forming effects. Moreover, a conspicuous inflammatory cell infiltrate has been described histologically in muscle affected by those PLA₂s (Lomonte et al., 1993).

Myotoxic PLA₂ homologues can be inhibited by polyclonal or monoclonal antibodies, as well as by heparin, plant extracts and serum/plasma factors (Melo and Ownby, 1999; Faure, 2000; Trento et al., 2001; Soares et al 2003; Biondo et al., 2003; Cavalcante, 2007). A thorough understanding of the local action of *Bothrops* snake venoms is necessary for the development of alternative therapeutic strategies. The low level laser therapy (LLLT) has been clinically used to promote anti-inflammatory effects, pain relief and accelerates the regeneration of the damage tissue (Kandolf- Sekulovic et al., 2003; Vladimirov et al., 2004). Furthermore, laser therapy has shown positive effects on the reduction of edema, pain and migration of inflammatory cells (Ferreira et al 2005; Albertini et al., 2007; Fikácková et al., 2007; Barbosa et al., 2008). However, the effect of laser therapy in the reduction of edematogenic reaction, leukocytes migration and myonecrosis induced by snake myotoxins venoms has not been yet determined. The aim of this work was to investigate the capacity of low level laser therapy in reducing the local inflammation and myonecrosis after injection of Bothropstoxin-I and Bothropstoxin-II (BthTX-I and BthTX-II, respectively) in the gastrocnemius muscle, being both isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.

Material e methods

Myotoxins

BthTX-I, BthTX-II were isolated and purified as previously described in the literature (Andrião-Escarso et al., 2000; Soares et al., 1998).

Animals

All animal care was in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and it was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the UNIVAP (University of the Vale do Paraíba) under number A020/2006/CEP. Male Swiss mice weighting 22-25 g were used though the experiment, randomly divided into groups of five animals each. Animals were kept in plastic cages with water and food *ad libitum*, maintained under controlled temperatures (26 °C) and on a 12 h light/dark cycle.

Laser device

A low level semiconductor GaAs (Gallium-Arsenate) laser, Theralase D.M.C. (São Carlos, S.P. Brazil), operating cw at 685 nm (red), was used through the whole experiment to irradiate the animals. The laser parameters were: 29 mW of power, 29s irradiation time and irradiated area of 0.2 cm²; these parameters correspond to a laser dose of 4.2 J/cm². Mice were laser irradiated at the same point that myotoxins injection took place at approximately 1.5 cm from the output of the laser device. The optical power was determined using a Newport Multifunction Optical Meter (model 1835C). Laser dose was low enough to avoid any thermal effect. This laser dose was chosen on the basis of studies reported in the literature that had shown a beneficial effect of the low level laser on the

inflammation process and myonecrotic effect (Dourado et al., 2003; Enwemeka et al., 2004; Barbosa et al., 2008).

Experimental protocol

BthTX-I or BthTX-II were prepared by diluting 2 mg/kg (animal weight) into 50 μ L of a sterile saline solution (SS) prior to initiate the experiment. The myotoxin was inoculated intramuscularly (i.m.) in the right gastrocnemius muscle; whereas the contralateral muscle (control) received the same volume of sterile saline solution. Animals were laser irradiated (LLL) at times: 0, 1, 3 and 12 h after myotoxin injection.

Surgical procedure and laser irradiation

Shaving and antiseptis was made in the local of the gastrocnemius muscle for BthTX-I or BthTX-II injection. The animals received i.m. injection of myotoxins, in the central part of the right gastrocnemius muscle and aprotogenic saline solution in the contralateral muscle. The animals were immobilized manually and the laser device was applied to both muscles (right and the contralateral) and in the same local of the injection of venom or saline solution. Control group received the same experimental procedure, however with laser turned off.

Morphological studies

Twenty four hours after the venom injection mice were euthanized with an overdose of anesthetics. Then, the gastrocnemius muscle was collected for histological processing. Briefly, after rinsing with phosphate-buffered-saline (PBS) the samples was fixed in 10 % buffered formalin for 24 h, rinsed again, dehydrated in graded ethanol series,

and embedded in paraffin. Histological cross sections of 5 mm were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) after Masson's trichrome (TM).

Myotoxic activity (Creatine kinase)

The myotoxic activity was determined through the dosage of the enzyme creatine-quinase (CK) of the gastrocnemius muscle after injection of BthTX-I or BthTX-II. Briefly, at 24 h the gastrocnemius muscles were dissected out and homogenized in 4 ml of phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.2. Homogenization was performed for 10 sec in a homogenizer (Brinkmann, Westbury, New York). Then, 1 mL of PBS containing 0.5 % of Triton X-100 was added. Homogenates were centrifuged at 5.000 x g for 5 min, and the supernatant was diluted to 1:35, with PBS for the quantification of CK activity. Muscle CK activity has been used as a quantitative index of muscle activity (Teixeira et al., 2003, 2005). The creatine-quinase activity was determined through the diagnostic Kit (LABTEST CK-NAC). The CK activity was expressed in U/L, with one unit defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of NADH per minute under the conditions of the assay.

Quantification of edema

To measure the muscle edema, mice were injected in the right gastrocnemius muscle with 50 μ L of BthTX-I or BthTX-II, at the same time the contralateral muscle received the same volume of a sterile saline solution, as it was described above. After mice being euthanized (24 h after myotoxin injection) their gastrocnemius muscles were dissected out. Both muscles were weighted and the edema was expressed as the percentage

of the increase in the weight of the myotoxin injected muscle compared to the corresponding contralateral muscle (Teixeira et al., 2003).

Quantification of inflammatory infiltrate in muscle

To quantify the inflammatory infiltrate, after the injection of myotoxins, mice were euthanized and the gastrocnemius muscles were dissected out and chopped with a blade into very small pieces before the addition of 2 mL of PBS. The suspension was incubated for 30 min at 4°C. Then, it was filtered through gauze and the gauze was washed with an additional 1 mL of saline solution. After that, a fraction of the filtered solution was diluted in Turk solution (1:20), for total counting of leukocytes in a Neubauer chamber. Suspensions were centrifuged for 6 min at 800 rpm and the pellet resuspended in 100 µL of PBS. Differential leukocytes were stained in Instant-Prov (Teixeira et al., 2003).

Statistical analysis

Mean and standard deviation were calculated for each group. To establish whether the difference between the mean values of two experimental groups was significant the Student's t-test was performed, using a statistical significance level of $P < 0.05$. When more than two groups were compared a two-way analysis of variance was applied, followed by a Tukey–Kramer test.

Results

Edema formation induced by BthTX-I or BthTX-II and LLLT treatment.

Intramuscular injection of 2 mg/kg of BthTX-I or BthTX-II caused a prominent weight increase of injected gastrocnemius muscle, at 24 h after injection, as compared to control muscle (Figure 1). BthTx II caused the most pronounced effect. The LLLT significantly reduced edema formation by 41 % and 60.7 %, for BthTX I and BthTX II, respectively.

Inflammatory infiltrate in gastrocnemius muscle induced by BthTX-I or BthTX-II and LLLT treatment.

The total number of leukocytes into gastrocnemius muscle was determined 24 h after intramuscular injection of 2 mg/kg of BthTX-I or BthTX-II. Both myotoxins were able to induce an inflammatory infiltrate at 24 h after to be inoculated (BthTX-I: $330 \pm 56 \times 10^5$ cells/mL; BthTX-II: $310 \pm 74 \times 10^5$ cells/mL) (figure 2A). It can be observed from the same figure that there is a statistically significant reduction on the number of leukocytes with the LLLT by 57,5 % and 51,6 % for the BthTX-I and BthTX-II groups, respectively.

A differential cell counts showed that cells present in the gastrocnemius muscle were predominantly polymorphonuclear leukocytes, mainly neutrophils. Figure 2B displays the number of polymorphonuclear leukocytes for both groups BthTX-I ($261 \pm 75 \times 10^5$ cells/mL) and BthTX-II ($231 \pm 79 \times 10^5$ cells/mL). It is obtained that the laser treatment induces a statistically significant reduction on the number of polymorphonuclear leukocytes (BthTX-I: $6.4 \pm 5 \times 10^5$ cells/mL and BthTX-II: $45 \pm 14 \times 10^5$ cells/mL),

reduction that is more remarkable when compared to the number of total leukocytes. On the other hand, the number of mononuclear cells (BthTX-I: $43 \pm 17 \times 10^5$ cells/mL and BthTX-II: $31 \pm 13 \times 10^5$ cells/mL) presents a statistically significant increase for the laser irradiated animals (BthTX-I: $123 \pm 47 \times 10^5$ cells/mL and BthTX-II: $97 \pm 27 \times 10^5$ cells/mL), as it can be seen from the Figure 2C.

Effect of LLLT on myonecrotic activity in gastrocnemius muscle induced by BthTX-I or BthTX-II.

The myonecrotic effect into gastrocnemius muscle was determined 24 h after intramuscular injection of 2 mg/kg of BthTX-I or BthTX-II and it is displayed in Figure 3. It can be seen for that figure that both myotoxins were able to induce a decline in muscle CK contents at 24 h after its injection, compared to control (control: 2.274 ± 78 U/L; BthTX-I: 1.060 ± 67 U/L and BthTX-II: 1.419 ± 218 U/L). The LLLT produced a statistically significant increment in muscle CK content of 60 % and 43 % by BthTX-I or BthTX-II envenomation at 24 h, respectively.

Histopathological analysis

The acute local pathological alterations induced by i.m. injection of BthTX-I or BthTX-II are illustrated in Figure 4. The degenerative phase included the appearance of necrotic areas of muscle tissue that occur as soon as 24 h post-injection. Control muscle, showed normal structure appearance of cells with regular fibers and defined muscular fascicles, and integrate membranes (Fig. 4A). Light micrographs sections, showed considerable changes of mice gastrocnemius muscle after 24 h of i.m. inoculation by

BthTX-I or BthTX-II. It includes vascular congestion, edema, loss of the definition of the muscular fascicles and infiltration of inflammatory cells (Figs. 4B and 4C). LLLT treatment reduced the destroyed fibers when compared with the muscle that was injected with the BthTX-I or BthTX-II at 24 h (Figs. 4D and 4E).

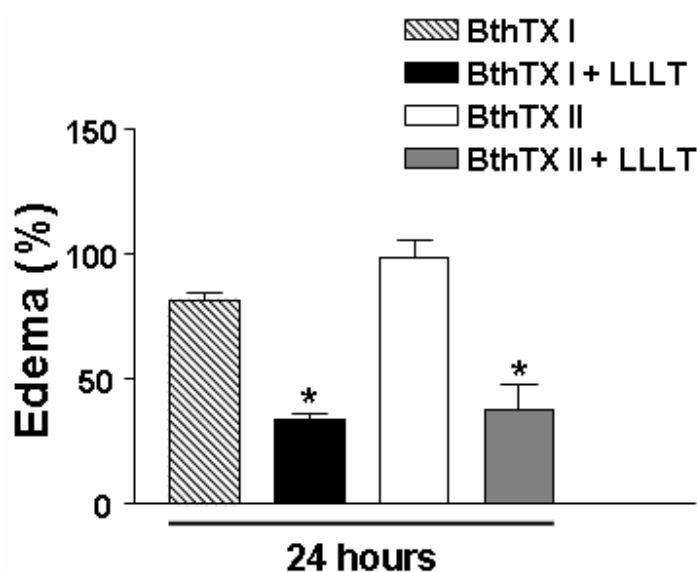


Figure 1: Edema induced by BthTX-I (inclined line bar), BthTX-II (empty bar), and treatment with LLLT (black and gray bars). Mice were injected i.m. in the right gastrocnemius muscle with 2 mg/kg i.m. of BthTX-I or BthTX-II, dissolved in 50 μ L saline solution. The groups received irradiation immediately and again 1, 3 and 12 h after BthTX-I or BthTX-II inoculation. Twenty four hours after the injection of myotoxins both right and left, gastrocnemius muscles were dissected out and weighted. Edema was expressed as the percentage of the increase in the weight of the myotoxin injected muscle compared to the corresponding contralateral muscle. * $P < 0.05$ versus the corresponding myotoxin group.

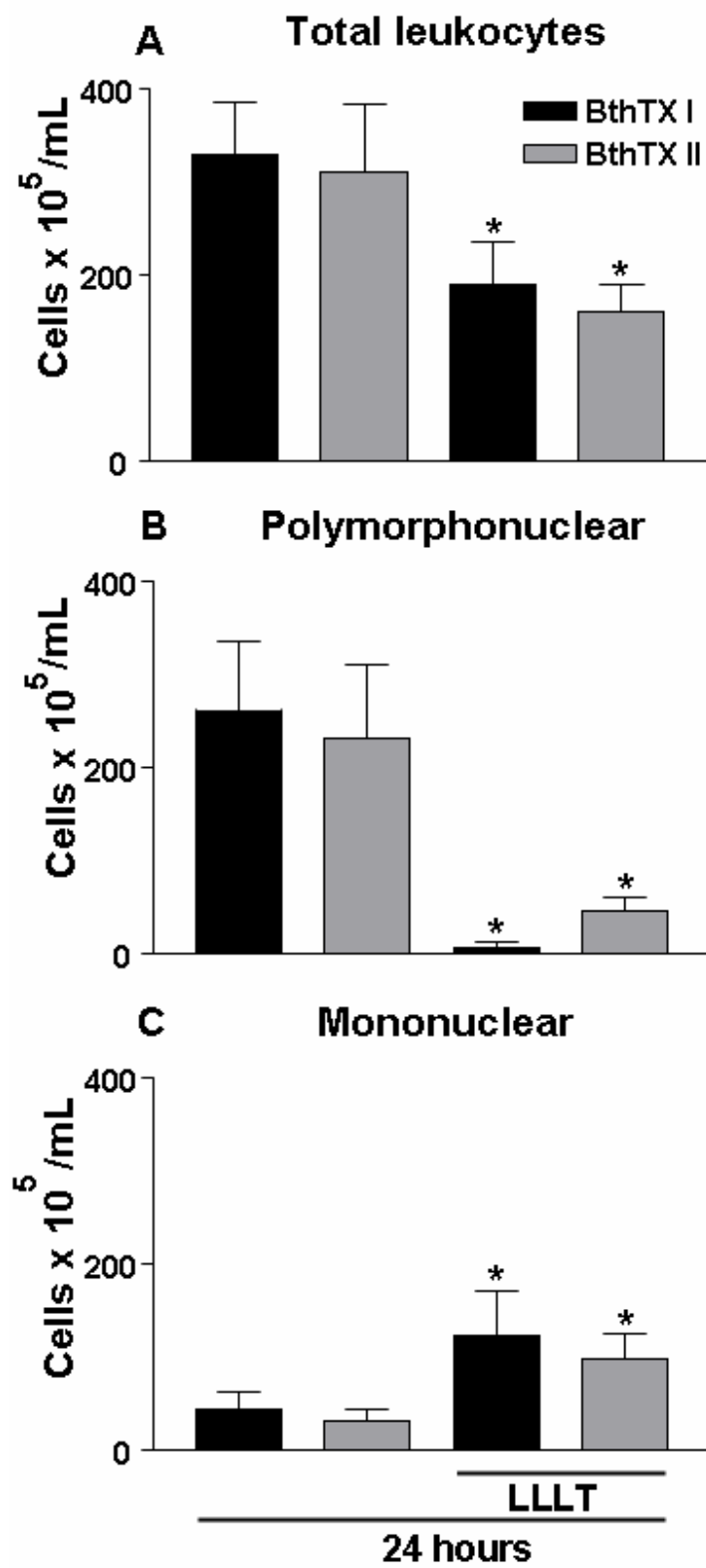


Figure 2: Leukocyte influx into the gastrocnemius muscle induced by injection of 2 mg/kg, i.m. of BthTX-I (black bar) or BthTX-II (gray bar). Mice were injected i.m. in the right gastrocnemius with BthTX-I or BthTX-II, dissolved in 50 μ L of saline solution. (A) Total leukocyte cells (B) polymorphonuclear cells and (C) mononuclear cells. The groups received four sessions of laser therapy (immediately, 1, 3 and 12 h) after BthTX-I or BthTX-II inoculation. After 24 h, both right and left gastrocnemius muscles were excised, chopped, and resuspended in saline solution. After 30 min incubation of 4°C, the suspension was filtered through gauze and centrifuged. The pellet was resuspended, and total and differential leukocyte counts were performed. * $P < 0.05$ versus the corresponding control (myotoxin) group.

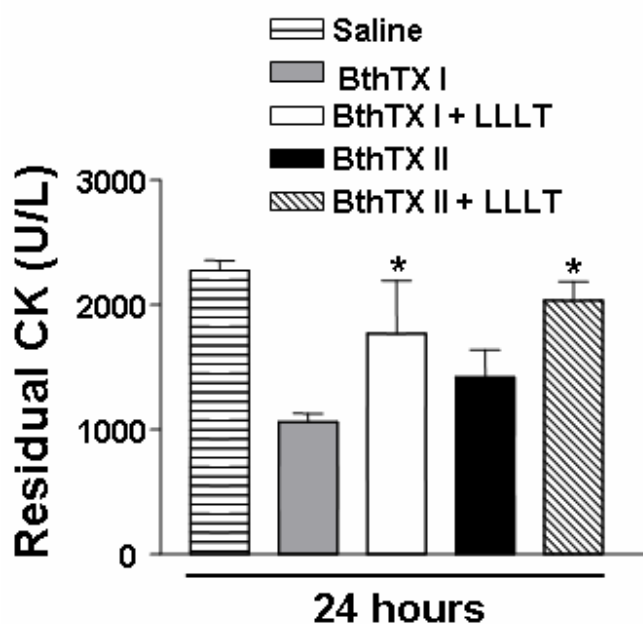


Figure 3: Myonecrosis in gastrocnemius muscle induced by BthTX-I or BthTX-II and LLLT treatment. Saline solution in contralateral muscle (horizontal line bar), BthTX-I (gray bar), BthTX-I + LLLT (empty bar), BthTX-II (black bar) and BthTX-II + LLLT (inclined line bar). Mice were injected i.m. in the right gastrocnemius with 2 mg/kg i.m. of BthTX-I or BthTX-II, dissolved in 50 μ L saline solution. The groups received irradiation immediately and again 1, 3 and 12 h after BthTX-I or BthTX-II inoculation. After 24 h after, both right and left gastrocnemius muscles were dissected. The activity creatine-quinase was determined through the diagnostic Kit (LABTEST CK-NAC) The CK activity was expressed in U/L, with one unit defined as the amount of enzyme that produces 1 μ mol of NADH per minute under the conditions of the assay. *P< 0.05 versus the corresponding myotoxin group.

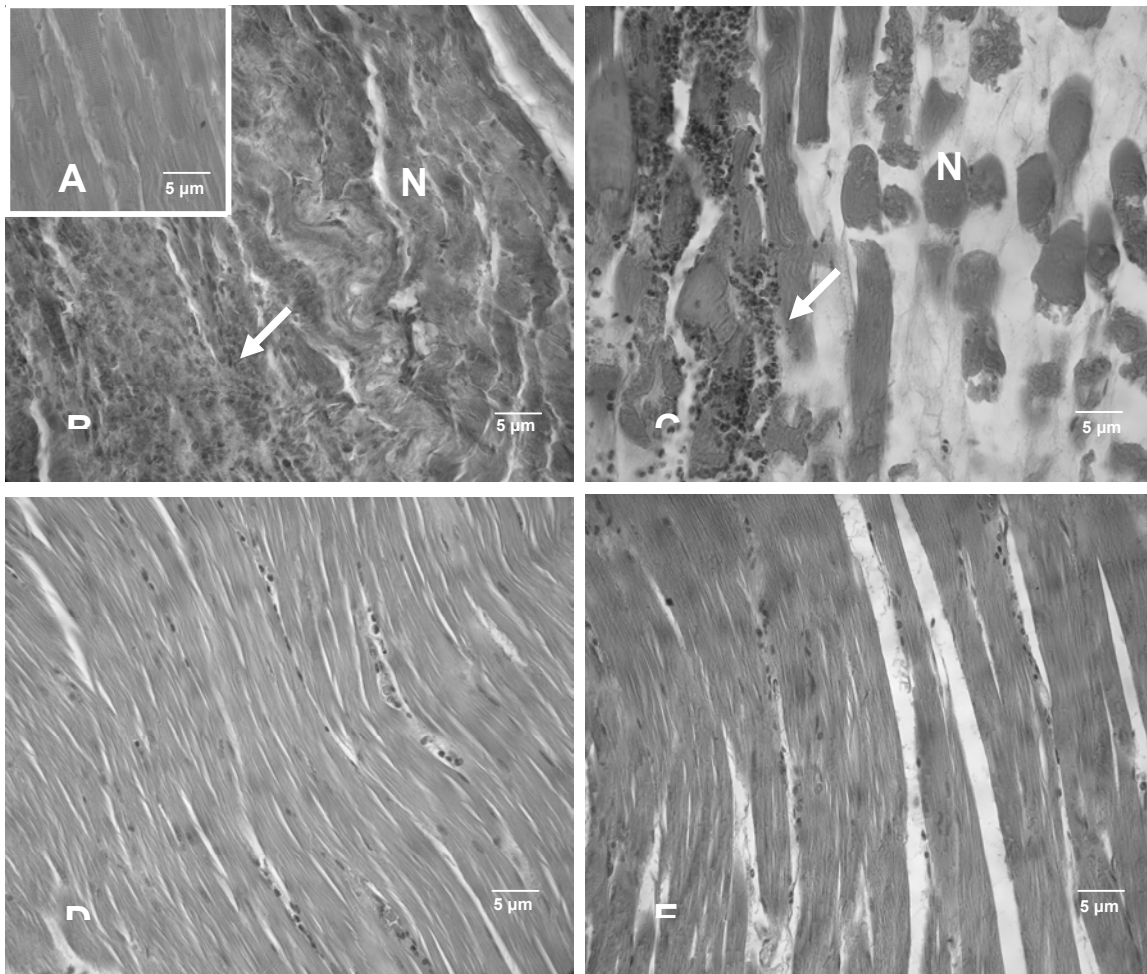


Figure 4: Light micrographs of sections of mice gastrocnemius muscle after 24 h of i.m. inoculation of BthTX-I or BthTX-II. (A) Control gastrocnemius muscle injected with a saline solution presents normal fibers. (B) BthTX-I and (C) BthTX-II inoculations show muscles for both cases with appearance of typical alterations of myonecrosis (N) and infiltration of leukocytes (arrows). Alterations of the gastrocnemius muscle after inoculation of BthTX-I and BthTX-II with LLLT are shown in (D) and (E), respectively. It can be observed that LLLT is effective to diminish the number destroyed fibers. Bar corresponds to 5 μm for all panels.

Discussion

Venom PLA₂s has been shown to induce inflammatory events, such as edema formation (Vishwanath et al., 1987; Lomonte et al., 1993; Lloret and Moreno, 1993) and to promote inflammatory cell infiltration (Zhang and Gopalakrishnakone, 1999; de Castro et al., 2000; Zuliani et al., 2005). Two myotoxic PLA₂s have been isolated and characterized from *Bothrops jararacussu* snake venom, Bothropstoxin I (BthTX-I) and Bothropstoxin II (BthTX-II) (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Andrião-Escarso et al., 2000). These proteins can be classified into two categories: the Asp49 PLA₂s, catalytically active, and Lys49 PLA₂s, devoid of significant catalytic activity upon artificial substrate (Ownby et al., 1999; Kini, 2003; Lomonte et al., 2003; Soares et al., 2004). In this work, the local inflammatory process and myonecrosis induced by BthTX-I (Lys49 PLA₂) and BthTX-II (Asp49 PLA₂) and their possible blockade by the laser treatment were investigated.

Both BthTX-I and BthTX-II induced a prominent edema in gastrocnemius muscle. This is in good agreement with previous observation of the edema-forming activity of venom PLA₂ (Borges et al., 2000; Zuliani et al., 2005). Our results demonstrated that the catalytic active of BthTX-II (Asp 49 PLA₂) is more potent to promote edema formation than that from BthTX-I (Lys 49 PLA₂). Various enzymatically inactive Lys-49 PLA₂s have been shown to induce edema (Lomonte et al., 1993; Landucci et al., 1998, 2000), clearly indicating the existence of molecular regions, different from the catalytic site in these PLA₂s homologues, which are responsible for mast cell degranulation and edema formation.

A prominent leukocyte infiltrate, composed predominantly of neutrophils, was observed after injection of BthTX-I or BthTX-II. This result corroborates previous studies in mouse skeletal muscle after injection of *B. jararacussu* venom (Gutierrez et al., 1991). Others authors have also documented polymorphonuclear and mononuclear cellular infiltrates after injection of myotoxic PLA₂s from the venoms of *B. asper* (Lomonte et al., 1993) and *B. nummifer* (Gutierrez et al., 1989) in mouse skeletal muscle. Furthermore, Castro et al., (2000) showed that BthTX-I and BthTX-II are able to recruit leucocytes into the rat pleural cavity and that this effect is a consequence of generation of chemo attractant mediators (leukotriene B₄ and platelet-activating factor) by the action of these proteins stimulating cytosolic PLA₂. In our model, both myotoxins showed to have the same potency to promote leukocyte influx into gastrocnemius muscle. In contrast to our results, Castro et al., (2000) showed that BthTX-II seems to be more potent leukocyte attractant (particularly of neutrophils) than BthTX-I in rat pleural cavity. The mechanisms underlying these differences are still unclear; we could speculate that such discrepancies could be due to the animal model studied and/or the local of myotoxin injection.

BthTX-I and BthTX-II induced myonecrosis in gastrocnemius muscle 24 h after its injection, as measured by the residual muscle CK levels. The decrease in CK activity in muscle indicates the presence of myonecrosis (Teixeira et al., 2003, 2005). Histological results confirm CK results, which are in agreement with Silva et al., (2007). Also to these results the myonecrotic and edemathogenic effect is similar to Soares et al. (2002).

Envenomation by snakes is often treated by parenteral antiophidian serum administration. During serum therapy, the toxic systemic effect is usually reached, but neutralization of local tissue damage usually does not occur (Cardoso et al., 2003; Zamuner et al., 2004). Neutralization of snake venoms and isolated toxins by plant

extracts has been extensively explored as an alternative treatment to serum therapy (Biondo et al., 2003; Soares et al., 2005; Cavalcante et al., 2007). Natural and synthetic compounds such as heparin (Lomonte et al., 1994a), suramin (de Oliveira et al., 2003; Murakami et al., 2005), fucoidan (Angulo and Lomonte, 2003; Azofeifa et al., 2008) and animal serum factors (Fortes-Dias, 2002; Lizano et al., 2003) has also been studied.

Various studies have tested the efficacy of low level laser irradiation in inflammatory and tissue repair processes (Honmura et al., 1992, Albertini et al., 2007, 2008). In the present study we investigate the effect of the LLLT on the myotoxic and local inflammatory induced by BthTX-I or BthTX-II. Treatment with LLLT was capable to diminish by 41 and 60 % the edemathogenic activity and 57 and 51 % the leukocyte influx induced by BthTX-I and BthTX II, respectively. In the literature is reported that LLLT acts reducing the inflammation process and accelerates wound healing in rats (Enwemeka et al., 2004; Maiya et al., 2005). Several authors showed that laser irradiation caused inhibition of PGE₂ through a reduction of COX-2 mRNA level ((Shimizu et al. 1995; Nomura et al., 2001; Sakurai et al., 2000; Albertini et al., 2007). In addition, low level laser irradiation significantly inhibited the gene expression of IL-1 β and IFN- γ (Shimizu et al., 1995; Safavi et al., 2007). IL-1 β , PGE₂, and IFN- γ are involved in different immune responses and in the acute phase of inflammatory process (Abbas et al., 1999; Nomura et al., 2001). Also, IFN- γ is an important activator of macrophages and plays important role in the inflammatory process (Abbas, et al., 1999). IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ are key mediators in inflammatory processes and therefore, inflammation may be controlled by laser irradiation via decreased production of these mediators. In view of that, we could speculate that reduction in the inflammatory process caused by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom can be due to the inhibited expression of

IL- β and PGE₂ in LLLT treated mice. This hypothesis is supported by the observation of other authors showing that venom PLA₂ induces increase of cytokines, such as IL-1, IL-6 and TNF- α (Zuliani, et al., 2005). In our model, the number of mononuclear cells had an increase after LLLT, which is in accordance with the literature that shows that laser irradiation cause macrophage and lymphocyte stimulation (O'Brien et al., 1998; Dourado et al., 2003).

The LLLT significantly reduced cell damage caused by BthTX-I or BthTX II at 24 h, as evidenced by the increase in the muscle CK content. Moreover, histological observation showed that LLLT reduced the number of destroyed fibers when compared with the muscle that was only injected with myotoxins, without laser treatment. Similar results were found by Dourado et al., (2003), studying myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* venom treated with LLLT. They suggested that the laser is able to block the high ability of the venom to disrupt the integrity of plasma membrane. There are no data from the literature concerning LLLT treatment after injection of isolated myotoxins. Evidences are present in the literature that suggests that at cellular level photo-irradiation at low power causes significant biological effects such as: cellular proliferation, collagen synthesis, release of growth factors from cells (Sommer et al., 2001).

In conclusion, this work seems to indicate that LLLT is capable of inhibit inflammatory and myonecrotic processes caused by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. The observation of the fact that LLLT acts with the same intensity to reduce the inflammatory and myonecrosis processes for both BthTX-I and BthTX-II suggest that enzymatic activity is not relevant for the laser treatment. Furthermore, our results indicate that LLLT should be considered as a potentially therapeutic approach for treatment of local effects of *Bothrops* snakebite, as well as, an

interesting tool for the study of the mechanisms underlying the inflammatory process and myonecrotic activity induced by those venoms.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Vale Paraibana de Ensino (FVE). We also acknowledge MSc Carlos José de Lima for lending the laser equipment and MCs Leandro Procópio Alves for dose calculations of laser.

References

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 1999. Cellular and molecular immunology, chapter 3. W.B. Saunders.
- Albertini, R., Villaverde, A.B., Aimbire, F., Salgado, M.A.C., Bjordal, J.M., Alves, L.P., Munin, E., Costa, M.S., 2007. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 89, 50–55.
- Albertini, R., Villaverde, A.B., Aimbire, F., Bjordal, J., Brugnera, A., Mittmann, J., Silva, J.A., Costa, M.S., 2008. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 26, 19-24.
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake

- venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of Bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*. 82, 755–763.
- Angulo, Y., Lomonte, B., 2003. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1993–2000.
- Azofeifa, K., Angulo, Y., Lomonte, B., 2008. Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: Comparison of high- and low-molecular weight fractions. *Toxicon*. 51, 373–380.
- Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Sousa, L.G., Ribeiro, W., Cogo J.C., Zamuner, S.R., 2008. Effect of low power laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 51, 1236–1244.
- Biondo, R., Pereira, A.M.S., Marcussi, S., Pereira, P.S., França, S.C., Soares, A.M., 2003. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Bioquimie*.85(10)1017-1025.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., et al., 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂, *Comp. Biochem. Physiol.* 127. 21–31.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, S.A., Haddad, V.J., 2003. *Animais Peçonhentos No Brasil; Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Editora Sarvier, São Paulo.
- Castro, R.C. de, Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Leukocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon*. 38, 1773±1785.

- Cavalcante, W.L., Campos T.O., Dal Pai-Silva, M., Pereira, P.S., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Gallacci, M., 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 25.112, 490-497.
- Cecchini, A.L., Soares, A.M., Cecchini, R., de Oliveira, A.H.C., Ward, R.J., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2004. Effect of crotopotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from Bothrops snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 138, 429–436.
- da Silva, J.O., Fernandes, R.S., Ticli, F.K., Oliveira, C.Z., Mazi M.V., Franco, J.J., Giuliatti, S., Perreira, P.S., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2007. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. *Toxicon.* 50, 283-291.
- de Oliveira, M., Cavalcante, W.L., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Dal-Pai Silva, M., Gallacci, M., 2003. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon.* 42, 373–379.
- Dennis E.A., 1994. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipases A₂, *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13060.
- Dessen A.; 2000. Phospholipase A₂ enzymes: structural diversity in lipid messenger metabolism, *Structure Fold. Des.* 8, 15-22.
- Dourado, D.M., Favero, S., Baranauskas, V., Cruz-Hofling, M.A., 2003. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. *Lasers surg Med.* 33, 352-357.

- Enwemeka, C.S., Parker J.C., Dowdy, D.S., Harkness, E.E., Sanford, L.E., Woodruff, L.D., 2004. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomedicine Laser Surg.* 22, 323–329.
- Faure, G., 2000. Natural inhibitors of toxic phospholipases A₂. *Biochimie* 82. 833–840.
- Ferreira, D.M., Zângaro, R.A., Villaverde, A.B., et al., 2005. Analgesic effect of Ne-He (632.8 nm) Low-Level Laser Therapy on acute inflammatory pain. *Photomedicine and Laser Surgery.* 23, 177-181.
- Fikácková, H., Dostálová, T., Navrátil, L., Klaschka, J., 2007. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg.* 25, 297-303.
- Fletcher, J.e., Hubert, M., Wicland, S.J., Gong. Q.H., jiang, M.S., 1996. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and others myotoxins. *Toxicon.* 34, 1301-1311.
- Fortes-Dias, C.L., 2002. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A₂ in the blood plasma of snakes. *Toxicon.* 40, 481–484.
- Fuly, A.L., Soares A.M., Marcussi, S., Giglio, J.R., Guimarães, J.A., 2004. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie.* 86, 731–739.
- Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revta Biol. trop.* 28, 341-53.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., 1989. Local Tissue Damage Induced by Bothrops Snake Venoms. A Review. *Memorias do Instituto Butantan.* 51, 211-223.

- Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C., Homsí-Brandenburgo, M.I., Giglio, J.R., 1991. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp-Mol-Pathol.* 55, 217-229.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.* 33, 1405-1424.
- Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon.* 42, 915–931.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* 3 e 150.
- Harris, J.B., Grubb, B.D., Maltin, C.A., Dixon, R., 2000. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, notexin and taipoxin. *Exp. Neurol.* 161, 517–526.
- Homsí-Brandenburgo, M.L., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R., (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothroptoxin. *Toxicon.* 26, 615-627.
- Honmura, A., Yanase, M., Obata, J., Haruki, E., 1992. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med.* 12, 441-449.
- Kandolf-Sekulovic, L., kataranosvki, M., Pavlovic M.D., 2003. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol photoimmunol Photomed.* 19, 203-120.

- Kashima, S., Roberto, P.G., Soares, A.M., Astolfi-Filho, S., Pereira, J.O., Giuliati, S., Faria Jr., M., Xavier, M.A.S., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R., França, S.C., 2004. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects1: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie*. 86, 211–219.
- Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes *Toxicon*. 42, 827–840.
- Landucci, E.C.T., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257–263.
- Landucci, E.C.T.; Castro, R.C.; Pereira, M.F.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Marangoni, S.; De Nucci, G.; Antunes, E., 2000. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1289-1294.
- Lizano, S., Domont, G., Perales, J., 2003. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon*. 42, 963–977.
- Lloret, S., Moreno, J.J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*. 31, 949-956.
- Lomonte, B., Tarkowski, A.; Hanson, L.A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. *Inflammation*. 17, 93-105.

- Lomonte, B., Lundgren, J., Johansson, B., Bagge, U., 1994a. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon*. 32, 41-55.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U., Hanson, L.A., 1994a. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1509–1518.
- Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 42, 885–901.
- Maiya, G.A., Kumar, P., and Rao, L., 2005. Effect of low intensity Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg.* 23, 187–190.
- Melo, P.A., Ownby, C.L., 1999. Ability of wedelolactone, heparin, and *para*-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. *Toxicon*. 37, 199–215.
- Murakami, M.T., Arruda, E.Z., Melo, P.A., Martinez, A.B., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Arni, R.K., 2005. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the antitrypanosomal drug suram Priscilla Fróes Sebbe in. *J. Mol. Biol.* 350, 416–426.
- Newman, M.G., Takei, H.H., Carranza, F.A., 2002. *Clinical periodontology*, chapter 7. W.B. Saunders Company.
- Nomura, K., Yamaguchi, M., Abiko, Y., 2001. Inhibition of interleukin-1beta production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med. Sci.* 16, 218–223.

- Qadri, T., Bohdanecka, P., Tunér, J., Miranda, L., Altamash, M., Gustafsson, A., 2007. The importance of coherence length in laser phototherapy of gingival inflammation: a pilot study. *Laser Med Sci.* 22, 245-251.
- Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Prado Franceschi, J., 1984. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 22, 339-46.
- Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F.M., Teixeira, S.S., et al., 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 50, 153–165.
- Safavi, S.M., Kazemi, B., Esmaeili, M., Fallah, A., Modarres, A., Mir, M., 2007. Effects of low-level He–Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingival. DOI 10.1007/s10103-007-0491-5.
- Sakurai, Y., Yamaguchi, M., Abico, Y., 2000. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 108, 29-34.
- Shimizu, N., Yamaguchi, M., Goseki, T., Ozawa, Y., Saito, K., Takiguchi, H., et al., 1994. Cyclic-tension force stimulates interleukin-, 1 β production by human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 29, 328-333.
- Shimizu, N., Yamaguchi, M., Goseki, T., Shibata, Y., Takiguchi, H., Iwasawa, T., Abiko, Y., 1995. Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 74 , 1382–1388.

- Soares, A.M., Mancin, A.C., Cecchini, A.L., Arantes, E.C., França, S.C., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2001. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 877–888.
- Soares, A. M., Oshima-Franco, Y., Vieira, C.A., Leite, G.B., Fletcher, J.E., Jiang, M.S., Cintra, A.C.O., Giglio, J. R., Rodrigues-Simioni, L., 2002. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 34, 668–677.
- Soares, A.M., Marcussi, S., Stábeli, R.G., França, S.C., Giglio, J.R., Ward, R.J., Arantes, E.C., 2003. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 302, 193–200.
- Soares, A.M., Januário, A.H., Lourenço, M.V., Pereira, A.M.S., Pereira, P.S., 2004. Neutralizing effects of snake venoms exhibited by Brazilian plants. *Drugs Future* 29, 1105–1117.
- Soares, A.M., Ticli, F.K., Marcussi, S., Lourenço, M.V., Januário, A.H., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., Lomonte, B., Pereira, P.S., 2005. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr. Med. Chem.* 12, 2625–2641.
- Teixeira, C.F.P., Landucci, E.C.T., Antunes, E., Chacu, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon.* 42, 947-962.
- Teixeira, C.F.P., Chaves, F., Zamuner, S. R., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Cruz-Hofling, M.A., Fernandes, I., Gutiérrez, J.M., 2005. Effects of neutrophil depletion in the local

- pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int. J. Exp. Path.* 86, 107–115.
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S.C., et al., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon.* 46, 318–327.
- Tidball, J.G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, 345–353.
- Trento, E.P., Garcia, O.S., Rucavado, A., França, S.C., Batalini, C., Arantes, E.C., Giglio, J.R., Soares, A.M., 2001. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. *Biochemical Pharmacology.* 62, 1521–1529.
- Vladmirov Y. A., Osip, A. N., Klebanov G. L., 2004. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation *Bochemistry (Mosc).* 69, 81-90.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V., 1987. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from Habu venom and their interaction with the alkaloid aristocholic acid. *Toxicon.* 25, 501-515.
- Zamuner, S.R., Cruz-Hofling, M.A., Corrado, A.P., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L., 2004. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon.* 44, 259-71.
- Zhang, C., Gopalakrishnakone, P., 1999. Histopathological studies of the acute inflammation in synovial tissue of rat knee joint following intra-articular injection of phospholipase A₂ from Chinese cobra (*Naja naja atra*) venom. *Toxicon.* 37, 783–799.

Zuliani, J.P., Gutiérrez, J.M., Silva, L.L.C., Sampaio, S.C., Lomonte, B., Teixeira, C.F.P.,
2005. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and
Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon*. 46, 523-32.

5 DISCUSSÃO

O quadro clínico observado no envenenamento botrópico pode ser dividido em sistêmico e local (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTOS, 1999). As manifestações sistêmicas são caracterizadas por distúrbios na hemostasia, deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (HAITI et al., 1999), também pode ser observada sudorese, hipotensão arterial e hipotermia (CARDOSO, 1997). As manifestações locais, por sua vez, são caracterizadas por dor e edema, persistentes no local da picada e de instalação precoce, além de hemorragia e mionecrose (ROSENFELD, 1971; GUTIERREZ; LOMONTE, 1995). Em casos mais graves, pode haver dano tecidual que pode resultar em perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado (ROSENFELD, 1971).

Atualmente, o tratamento preconizado para o acidente ofídico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico. Contudo o antiveneno botrópico não reverte o efeito local induzido pelo veneno do gênero *Bothrops* com eficiência (PICOLO et al., 2002; ZAMUNER et al., 2004). Algumas alternativas têm sido propostas por muitos pesquisadores como tratamento coadjuvante ao antiveneno, tais como o uso de anticorpos recombinantes humanos, terapia usada com sucesso para o tratamento de tumores, rejeição de transplantes, artrites e alergias (HOOLIGER; HOOGENBOOM, 1998). Por esta razão o uso anticorpos recombinantes humanos no caso de acidentes ofídicos pode ser possível (CARDOSO et al., 1993). Também o uso de plantas medicinais tem sido muito usado por pesquisadores para tratamento no envenenamento ofídico (CAVALCANTE et al., 2007; JANUÁRIO et al., 2004). Contudo, todas as terapias avaliadas não se mostram eficientes

em neutralizar os efeitos locais produzidos pelo veneno de serpente botrópicas. Por este motivo, pesquisadores têm buscado cada vez mais alternativas para o tratamento do efeito local induzido pelo veneno botrópico, uma vez que a reação inflamatória e a mionecrose são importantes eventos ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*. Neste estudo foi investigado o uso da terapia a laser como alternativa para melhorar os eventos locais causados pelo veneno botrópico, ainda, foi verificada a eficiência da terapia a laser combinado com a soroterapia.

Os resultados demonstraram que a terapia a laser reduziu o efeito edematogênico bem como o influxo leucocitário causado pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. O veneno induziu edema no músculo gastrocnêmio de 3 até 24 h após sua injeção. Este resultado corrobora estudos prévios mostrando a habilidade do veneno em induzir formação de edema (TICLI et al., 2005; OLIVO et al., 2007). Neste modelo experimental a terapia a laser foi efetiva na redução do edema nos tempos de 3 e 24 horas após a injeção do veneno. Outros autores reportam que essa terapia reduz edema causado por carragenina (HONMURA et al., 1993; ALBERTINI et al., 2004; 2007). De acordo com a literatura a terapia a laser age reduzindo os níveis de PGE₂ e a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) (SHIMIZU et al., 1995; CAMPANA et al., 1998). Em seus estudos experimentais OLIVO et al. (2007), relataram que os venenos de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* aumentam a liberação de PGE₂ via expressão de COX-2 contribuindo com a formação de edema ocasionado por estes venenos. Diante deste resultado sugerimos que a terapia a laser age por reduzir os níveis de PGE₂, embora esta hipótese ainda requeira estudos adicionais. O veneno de *Bothrops jararacussu* causou um proeminente infiltrado leucocitário no músculo gastrocnêmio, predominantemente por neutrófilos, 24 h após a injeção do veneno. A terapia a laser foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos para o

músculo gastrocnêmio em 24 h. A terapia a laser reverte o efeito inflamatório e reduz significativamente a expressão de IL-1 β and IFN- γ (SAFAVI et al., 2007). Diante desse resultado, é possível que neste estudo, a terapia a laser pode ter modulado a ação de mediadores inflamatórios, reduzindo desta forma o número de células inflamatórias para o local da injeção do veneno.

Os resultados sobre mionecrose demonstram que as terapias combinadas (laser + antiveneno) não foram tão eficazes quanto à terapia a laser sozinha. Foi demonstrado através da análise histológica que a terapia a laser sozinha foi ineficiente em prevenir o efeito hemorrágico causado pelo veneno, no entanto, o antiveneno sozinho ou combinado com terapia a laser reduziu a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararacussu*. Este resultado comprova que a terapia com antiveneno reverte os efeitos sistêmicos, tais como o efeito hemorrágico, enquanto que a terapia a laser reverte o efeito local.

Ainda, foi investigada a capacidade da terapia a laser em reverter o efeito local ocasionada pelas miotoxinas BthTX-I (Lys49 PLA₂) e BthTX-II (Asp49 PLA₂) isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. Ambas as miotoxinas causaram um proeminente efeito edematogênico no músculo gastrocnêmio. Este resultado corrobora com Zuliani et al. (2005) que mostram um aumento da permeabilidade vascular causada pelas miotoxinas MT-II e III, isoladas do veneno de *B. asper*. Ambas miotoxinas causaram proeminente infiltrado leucocitário após a injeção. Este resultado está de acordo com o encontrado por Gutiérrez et al. (1991). Ao contrário de Castro et al. (2000), mostrou que a BthTX-II foi mais eficaz em atrair leucócitos, especialmente neutrófilos do que a BthTX-I na cavidade pleural em ratos. Esta discrepância de resultados pode ter sido em decorrência do modelo animal usado bem como a cavidade pleural usada para injetar a miotoxina. Também, em nossos resultados, foi mostrado que ambas as miotoxinas causaram efeito mionecrótico no

músculo gastrocnêmio 24 h após a injeção devido a diminuição do nível de CK no músculo (TEIXEIRA et al., 2005). As análises histológicas estão de acordo com o resultado de CK encontrado por Silva et al. (2007). O tratamento com a terapia a laser foi capaz de reduzir o efeito edematogênico, o influxo leucocitário e o dano celular induzido pelas miotoxinas BthTX-I e BthTX-II. Ademais, foi demonstrado, através da análise histológica que a terapia a laser reduz a destruição das fibras musculares. Este resultado esta de acordo com Dourado et al. (2003) em seus estudos utilizando o veneno de *Bothrops moojeni* e tratamento com laser.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a terapia a laser reduz de forma significativa o edema, a migração leucocitária e a mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e as suas miotoxinas isoladas, BthTX-I e BthTX-II. Além disso, a terapia a laser quando combinada com a terapia antiveneno reduz consideravelmente o efeito edematogênico ocasionado pelo veneno. De acordo com estes resultados, sugere-se que terapia a laser pode ser considerada como um potencial terapêutico do efeito local no tratamento de picadas de serpentes do gênero *Bothrops* e, ainda uma ferramenta para estudar e compreender os mecanismos induzidos por estes venenos.

REFERÊNCIAS

ACOSTA DE PEREZ, O.; TEIBLER, P.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ, N.M.; TRULLS, H.; MARUÑAK, S. Edema and myonecrosis induced by *Bothrops jararaca* venom of Argentina in mice. **Acta physiol. pharmacol. ther. latinoam.**, v.46, n.4, p. 233-238, 1996.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C.; CORREA, F.I., et al., Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminium-arsenite (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J. photochem. photobiol. B.**, v. 74, n. 2-3, p. 101-107, 2004.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.V.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.C.; BJORDAL, J.M.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; COSTA, M.S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **J. photochem. photobiol. B.**, v.89, n.1, p. 50–55, 2007.

AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modification on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 735-763, 2000.

BALSINDE, J.; SHINOHARA, H.; LEFKOWITZ, L.J.; JOHNSON, C.A.; BALBOA, M.A.; DENNIS, E.A. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 37, p. 25967-25970, 1999.

BARBOSA, A.M.; VILLAVERDE, A.B.; SOUSA, L.G.; RIBEIRO, W.; COGO J. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of low power laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v.51, p. 1236–1244, 2008.

BARBOSA, A.M.; AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.P.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.42, p. 515–523, 2003

BARRAVIERA, B. Acidentes ofídicos. In: VERONESI, R.; FOCÁCCIA, R. (Org.). **Tratado de Infectologia**. 8a. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. v. 1, p. 1561-1577.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy – still not an established clinical tool. **Lasers Surg. Med.**, v. 16, n. 4, p. 331–342, 1995.

BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A.M.; CURY, Y.; FARSKY, S.H. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v.41, n.5, p 583-593, 2003.

BENCHIMOL, J. L.; TEXEIRA, L. A. **Cobras, lagartos e outros bichos: uma história comparada dos Institutos Oswaldo Cruz e Butantan**. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1993.

BEVENUTI, L. A.; FRANCA, F.O.; BARBOARO, K. C.; NUNES, J. R.; CARDOSO, J. L. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. **Toxicon**, v.42, n.3, p. 331-334, 2003.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochemie**, v.85, p. 1017-1025, 2003.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. Uma revisão. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.3, p. 735-746, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnósticos e Tratamentos de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: FUNASA, 1999. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6^a.ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

BRAZIL, V. A Defesa Contra o Ophidismo. São Paulo: Pocar & Weiss, 1911.

CALIL-ELIAS, S.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A.M.B.; MELO, E.P.A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz. j. med. biol. res.**, v.35, n. 10, p.1233-1235, 2002.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T.; SANCHEZ, E.F. Characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n.5, p. 501-509, 2002.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO.; JURI, H.; PALMA, J.A.; Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J. Clin. Laser Med. Sur.**, v.16, n. 6, p. 317-320, 1998.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Latin America. **Comstock Publishing/Cornell University Press**, Ithaca, NY. 1989.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of evenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. MED.** 86, p. 315-325, 1993.

CASTRO, R.C.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.H., GIGLIO, J.R., MARANGONI, S., DE NUCCI, G., ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v.38, n.12, p. 1773-1785, 2000.

CAVALCANTE, W.L.; CAMPOS T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v.25; 112(3). p. 490-497, 2007.

CHACUR, M.; PICCOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v.39, n.8, p. 1173–1181, 2001.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v.33, n.1, p. 31-39, 1995.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C.F.P.; GUTIÉRREZ, J.M. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, n.2, p. 171-178, 2005.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v.36, n.6, p. 823-846, 1998.

COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.; HYSLOP, S. DE NUCCI G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochemie**, v.88, n.12, p. 1947-1959, 2006.

COOLS, J. **La terapia laser hoy**. Barcelona: Centro Documentación Láser de Meditec; 1984.

DA SILVA, J.O.; FERNANDES, R.S.; TICLI, F.K., OLIVEIRA, C.Z., MAZI, M.V.; FRANCO, J.J.; GIULIATTI, S.; PERREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v.50, n.2, p. 283-291, 2007.

DA SILVA, N.M.V.; ARRUDA, E.Z.; MURAKAMI, Y.L.B.; MORAES, R.A.M.; EL-KIK, C.Z., TOMAZ, M.A.; FERNANDES, F.F.A.; OLIVEIRA, C.Z.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; MELO, P.A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v.50, n.2; p. 196-205, 2007.

DE CASTRO, R.C.; LANDUCCI, E.C.; TOYAMA, M.H.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leukocytes recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v.38, n.12, 1773-1785, 2000.

DENNIS, E.A. Diversity of groups types, regulation and function of phospholipases A₂, **J. Biol. Chem.**, v. 269, n.18, p. 13057-13060, 1994.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V.; CAMPOS, A.C.M.R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Complement activation by animal venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v.14, p. 375-400, 1995.

DOIN-SILVA, R.; BARANAUSKAS, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HOFLING, M.A. The Ability of Low Level Laser Therapy to Prevent Muscle Tissue Damage Induced by Snake Venom. **Photochem. Photobiol.**, Jul 17, 2008. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00397.x

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F. The efficacy of the bothropic-crotalic antivenom in

the neutralization of the main Bothrops jararacussu venom effects. **Rev. inst. med. trop.** v.34, n.2, p. 77-83, 1992.

DOURADO, D.M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M.A. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, n. 35, p. 352-357, 2003.

FARSKY, S. H. P.; COSTA-CRUZ, J. W. M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v.35, p. 185–193, 1997.

FERREIRA, D.M.; ZANGARO, R.A.; VILLAVERDE, A.B.; CURY, Y., FRIGO, L., PICCOLO, G., LONGO, I., BARBOSA, D.G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.2, p. 177–181, 2005.

FLETCHER, J.E., HUBERT, M., WICLAND, S.J., GONG, Q.H., JIANG, M.S. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and others myotoxins. **Toxicon**, v.34, n.11-12, p. 1301-1311, 1996.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v.31, n.12, p. 1551–1559, 1993.

FRANCA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C., FRANCA, F.O.S., HUI, WEN, F., MÁLAQUE, C.M., HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72-86.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In. KINI, R. M. (ed.). **Venom phospholipases A₂ Enzymes, Structure, Function and Mechanism**. Chichester: Wiley 1997. p. 321-352.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v.36, n.11, p. 1529-1538, 1998.

GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, A.; PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, v.19, n.4, p. 493-500, 1981.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n.11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v.51, n.1, p. 80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memórias Instituto Butantan**, v..51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; NÚÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol.**, v.55, n.3, p. 217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, n.9-10, p. 841–850, 2000.

HOGUE, A.R.; ROMANOHOGE, S.A. R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v.42/43, p. 373-396, 1978/1979.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.

HONMURA, A.; ISHII, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers surg. Med.**, v. 13, n. 4, p. 463-469, 1993.

HOOLIGER, P. and HOOGENBOOM, H. Antibodies come back from the brain. **Nature Biotechnol.**, v.16, p. 1015-1016, 1998.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANCA, S.C.; SOARES, A.M. Neo-

clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v.150, p. 243-251, 2004.

KARU, T.I. Molecular mechanism of therapeutic action of low intensity laser light. **Dokl. Akad. Nauk SSSR (Proc. USSR Acad. Sci., biophysics)**, v.291, n.5, p. 1245-1249, 1986.

Karu, T.I. Photobiological fundamentals of low-power-laser therapy. **IEEE j. quantum electron**, v.23, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T.I.; RYABYKH, T. P.; FEDOSEYEVA, G.E.; PUCHKAVA, N.I. Helium-Neon laser induced respiratory burst of phagocytes cells. **Lasers surg. med.**, v.9, n.6, p. 585-588, 1989.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci.**, v.2, n.1, p. 53-74, 1988.

KOCHVA, E. The origin snakes and evolution of the apparatus. **Toxicon**, v. 25, n.1, p. 65-106, 1987.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins lipid. mediat.**, v.68-69, p. 3-58, 2002.

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. j. pharmacol.**, v.349, p.257-263, 1998.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n.8, p. 963-977, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipases A₂ mytoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v.17, n.2, p. 93-105, 1993.

LOPES, L. A.; BRUGNERA, JUNIOR. A. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, p. 100-120, 1998.

MAIORANO, V. A., et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v.102, n.3, p. 364–370, 2005.

MAIYA, G. A.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of low intensity Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomed. laser surg.**, v. 23, n.2, p. 187–190, 2005.

Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes por Animais Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1999.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors. **Curr. top. med. chem.**, v.7, p. 743-756, 2007.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities, **Pharmacol. ther.**, v.48, p. 223–236, 1990.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O., HUI, WEN, F., MÁLAQUE, C.M., HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, p. 33-61.

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and Botropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v.31, n.3, p. 285-291, 1993.

MELO, P.A.; NASCIMENTO, M.C.; MORS, W.B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* extract and constituents. **Toxicon**, v.32, p.595-602, 1994.

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and *para*-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, 37(1), p. 199–215, 1999.

MILANI JUNIOR, R. *et al.*, Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, v.90, n.5, p. 323-34, 1997.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J.L.; TEIXEIRA, C.F.P. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v.49, p. 615-624, 2007.

MUKHEERJEE, A. B.; MEILE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzyme: regulation and physiological role. **Biochem pharmacol.**, v.5, p. 1- 10, 1994.

NASCIMENTO, P. M.; PINHEIRO, A. L. B.; SALGADO, M. A. C.; RAMALHO, L.M.P. A Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in Rats. **Photomed. laser surg.**, v.22, n.6, p.513–518, 2004.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of interleukin-1beta production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. **Lasers med. sci.**, v.16, n.3, p. 218–223, 2001.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. F. P.; WALLACE, J. L.; GUTIÉRREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cicloxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v.49, n.5, p.670-677, 2007.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S., GIGLIO, J. R.; CRUZ-HOFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of *bothropstoxin*-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, v.39, n.10, p. 1477-1485, 2001.

OTERO-PATIÑO, R. *et al.* A randomized blinded comparative trial of one pepsine-digested and two whole Igg antivenoms in *Bothrops* snake bites in Uroba, Colombia. **Am. j. trop. med.**, v. 58, n.2, p. 183-189, 1998.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p. 411-445, 1999.

PERKINS J.R.; PARKER, C.E.; TOMER, K.B. The characterization of snake venoms using capillary electrophoresis in conjunction with electrospray mass spectrometry: Black Mambas. **Electrophoresis**, v.14, n.5-6, p. 458-468, 1993.

PETRACHI, F.; MATZUZZI, G. Applicazione Del laser "freddo" (I.R. a semiconduttori) come antalgico ed antiflogistico nelle patologie osteo-articolari e muscolo-tendinee. **Clin. Terap.**, v. 133, n.4, p. 219-222, 1990.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* snake venoms. **Bra. Jou. of Med. and Biol. Res.** 35(10). p. 1221-1228, 2002.

PINHEIRO, A.L.B.; CAVALCANTI, E.T.; PINHEIRO, T.I.; ALVES, M.J.; MIRANDA, E.R.; QUEVEDO, A.S.; MANZI, C.T.; VIEIRA, A.L.; ROLIM, A. B. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med Surg.**, v.16, n.4, p. 223-226, 1998.

PINHEIRO, R.M.; CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflamm. res.**, v.51, n. 12, p. 603–610, 2002.

PINHO, F.M.O. ; OLIVEIRA, E.S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. assoc. med. bras.**, v. 50, p. 1-10, 2004.

PINHO, F.M.O.; BURDMANN, E.A. Fatal cerebral hemorrhage and acute renal failure after young *bothrops jararacussu* snake bite. **Renal fail.**, v. 23, n.2, p. 269–277, 2001.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo **Rev. assoc. med. bras.** v. 47, n. 1, p. 24-29. 2001.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E.M.; PEITSCH, M.C.; WELLS, T.N.; CLEMETSON, J.K. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem J.** 1(319), (Pt 3), p. 961-968, 1996.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new

- Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochim. biophys. acta**, v.1770, n.4, p. 585-593, 2007.
- PUORTO, G. Acidentes por cobras – I. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 143-188.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v.22, n.3, p. 339-346, 1984.
- RABELO, S.B.; VILLAVERDE, A.B.; NICOLAU, R.A.; SALGADO, M.C.; MELO, M. S.; PACHECO, M. T.T. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed. laser Surg.**, v.24, n.4, p. 474-479, 2006.
- REDDY, G.K. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair Regen.** v.9, n.3, p. 248–255, 2001.
- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochemie**. 83, p. 471-479, 2001.
- RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, M.L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.50, p.153-163, 2007.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGES, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v.10, p.475-489, 1983.
- ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South América. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (eds). **Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates**. New York: Academic Press, 1971.v.2 p. 346-381.
- SAFAVI, S.M.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; FALLAH, A.; MODARRESI, A.; MIR, M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α ,

IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingival. **Lasers med. sci.**, v.23, n.3, p.331-335, 2008.

SANCHES, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, p. 95-103, 1992.

SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; ACHAFFER, P.M.; BUSCH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effect of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. photochem. photobiol. B.**, v. 54, p. 55-60, 2000.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L. Phototherapy with low intensity laser irradiation for a chronic radiation ulcer in a patient with lupus erythematosus and diabetes mellitus. **Br. j. dermatol.**, v. 137, n. 5, p.:840-841 1997.

SHIMIZU, N.; YAMAGUCHI, M.; AND GOZEKI, T., et al. Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.** 74(7). p. 1382-1388, 1995.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. biophys. acta.**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

TATARUNAS, Angélica Cecília; MATERA, Julia Maria; DAGLI, Maria Lucia Zaidan. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 13, n. 2, Apr. 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 Nov. 2008. doi: 10.1590/S0102-86501998000200004.

TEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D. A. Antivenoms: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. **Toxicon**, v.29, p. 1419-70, 1991.

TEIXEIRA, C.F.P.; CHAVES, F.; ZAMUNER, S.R.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. exp. pathol.**, v.86, p. 107-115, 2005.

TEIXEIRA, C.F.P.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACU, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v.42, p.947-962, 2003.

TICLI, F.K.; CAMBRAIA, R.S.; HAGE, L.I.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.; FONTES, M.R.; FRANCA, S.C.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Rosmarinic acid, a new phospholipase A₂ snake venom inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): anti-inflammatory and antimyotoxic properties. **Toxicon**, v.46, 318-327, 2005.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents actions.**, v.26, n.3-4, p. 292-300, 1989.

VAN DEN BERGH, C.J.; SLOTBOOM, A.J.; VERHEIJ, H M.; DE HAAS, G.H. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. **J. cell biochem.**, v.39, p. 379-390, 1989.

VERONESE, E.L.; ESMERALDINO, L.E.; TROMBONE, A.P.; SANTANA, A.E.; ANDISSON, F.A.; CAMPOS, M.I.; BECHARA, G.H.; KETELHUT, I.; CINTRA, A.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v.12, n.1-2, p. 123-130, 2005.

VLADMIROV, Y. A.; OSIP, A. N.; KLEBANOV, G. L. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry, (Mosc)**., v. 69, n.1, p. 81-90, 2004.

WALSH, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 1. Soft tissue applications. **Aust. dent. j.**, v.42, n.4, p.247-254, 1997. DOI: 10.1111/j.1834-7819.1997.tb00129.x.

WANG, L.M.; TOYOSHIMA, A.; MINESHITA, S.; WANG, X.X.; YAMAMOTO, T.; NOMURA, Y.; YANG, L.; KOIKEI, Y.; SHIBA, K.; HONDA, Y. The anti-inflammatory effects of ketoprofen in animal experiments. **Drugs exp. clin. res.**, v.23, p. 1-6, 1997.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.M. Carrageenan-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol.** 111, p. 544-547, 1962.

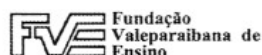
ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARÁ, M.N.; TEIXEIRA, A.S.; TEIXEIRA, C.F.P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions peritoneal leucocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, n.10, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S.R.; TEIXEIRA, C.F.P. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators inflamm.**, v.11, n.6, p.351-357, 2002.

ZAMUNER, S.R.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n.3, p. 259-272, 2004.

ZULIANI, J.P.; GUTIÉRREZ, J.M.; SILVA, L.L.C.; SAMPAIO, S.C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523-532, 2005.

Anexo: Certificado do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A020/2006/CEP, intitulado “*Efeito do laser de baixa potência He-Ne em mionecrose causada pelo veneno total de serpente Bothrops jararacussu (jararacussu)*”, sob a responsabilidade da Profa. Ana Maria Barbosa, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 27 de junho de 2006.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP