

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

KATIA MARGARETH BITTON DE MOURA

**EFEITO DA FOTOTERAPIA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E NA
MIONECROSE INDUZIDAS PELO VENENO DE *Bothrops asper***

**São José dos Campos, SP
2009**

Kátia Margareth Bitton de Moura

Efeito da Fototerapia na Reação Inflamatória e na Mionecrose Induzidas pelo Veneno de *Bothrops asper*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre Engenharia Biomédica.

Orientador: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner e Prof. Dr. Egberto Munin

São José dos Campos, SP

2009

M887e

Moura, Kátia Margareth Bitton de

Efeito da fototerapia na reação inflamatória e na mionecrose induzidas pelo veneno de *Bothrops asper*. / Kátia Margareth Bitton de Moura; Orientadores: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, Prof. Dr. Egberto Munin. -- São José dos Campos, 2009.

1 disco laser: color.;

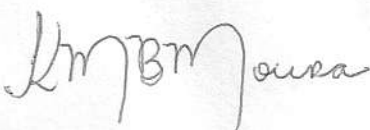
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

1. Bothrops 2. Veneno 3. Inflamação 4. Terapia a Laser de Baixa Intensidade I. Zamuner, Stella Regina, orient. II. Munin, Egberto, orient III. Título

CDU: 616-002

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

Assinatura do Aluno:

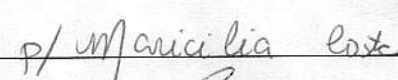
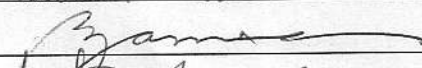
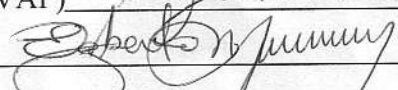



Data: 20 fevereiro de 2009

KÁTIA MARGARETH BITTON DE MOURA

**“EFEITO DA FOTOTERAPIA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E NA MIONECROSE
INDUZIDAS PELO VENENO DE *Bothrops asper*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre 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. Dr. **JOSÉ CARLOS COGO** (UNIVAP) 
Prof.^a. Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP) 
Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNICASTELO) 
Prof.^a. Dra. **MARUCIA CHACUR** (USP) 

Prof.^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa
Diretor do IP&D – UniVap
São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2009.

Dedico

À DEUS,
Obrigada, Senhor, pela Tua presença,
sem a qual nada seria possível.
Obrigada pelo amparo na caminhada,
Obrigada, acima de tudo por me permitir
chegar até aqui!

Aos meus pais,
“A vocês, pais por natureza, opção e amor,
Não bastaria dizer que não tenho palavras para
agradecer tudo isso.
Pelo apoio “financeiro, emocional e acima de
tudo, o apoio incondicional”.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Stella, pela paciência interminável, que ao me incentivar com toda sua “energia” tornou a realização deste trabalho um fato descomplicado...

A Dra. Ana Maria Barbosa, pelo carinho, pela dedicação, pela paciência, pelos ensinamentos e bons exemplos.

Às colegas do laboratório Ludmila e Nikely, pelas conversas e convívio sempre agradável.

À Sabrina, que viajou comigo não só no carro, mas nas conversas, nas angústias da ida e volta e nas dificuldades.

A Valéria, D. Neuza e D. Ivone que tiveram sincera dedicação e paciência ao ouvir minhas solicitações.

À Rúbia e a Rosângela que sempre me atenderam com muita dedicação.

Ao Dr. João Orlando, pela histologia dos músculos gastrocnêmios e seus funcionários que me receberam de maneira muito carinhosa, meu profundo e sincero obrigado.

Aos meus irmãos, filhos e amigos, pela compreensão da distância e ausência em muitos momentos. Obrigada por torcerem por mim e também, pela grande ajuda nos bastidores deste trabalho e pelo auxílio, nos pedidos de socorro.

Talvez me esqueça de algumas pessoas, mas, seguramente todos tiveram grande auxílio na concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

"A vida só pode ser comprendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida,
olhando-se para frente."

(Soren Kierkegaard)

EFEITO DA FOTOTERAPIA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E NA MIONECROSE INDUZIDAS PELO VENENO DE *Bothrops asper*

Resumo

A reação inflamatória, no local da picada, é uma consequência comum nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, que dependendo da extensão, pode determinar a perda do membro afetado. O tratamento utilizado, atualmente, no caso de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* é a soroterapia. No entanto, esse tratamento é ineficaz em neutralizar os efeitos locais. No presente estudo, foi avaliado o efeito da terapêutica de baixa potência na resposta inflamatória e na mionecrose induzidos pelo veneno de *Bothrops asper*. Para todos os protocolos utilizados, os animais receberam irradiação com laser de baixa potência (LBP) (685 nm, 100 mW), LED Infravermelho (120 mW, 945 nm) e LED vermelho (110 mW, 635 nm) nos tempos: imediatamente, 1 e 2 h após a aplicação do veneno. A inflamação local foi avaliada através da formação de edema nos músculos plantar e gastrocnêmico e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais. Os tratamentos com o laser e o LED reduziram de forma semelhante a formação de edema, tanto no músculo plantar quanto no músculo gastrocnêmio, após a aplicação do veneno. Todos os tratamentos utilizados reduziram de maneira significativa a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno. A atividade miotóxica induzida pelo veneno de *Bothrops asper* foi avaliada através da determinação da liberação de creatino-quinase (CK) no plasma e no músculo gastrocnêmico, bem como da análise histológica, 24 horas após a injeção do veneno. Os resultados mostraram que o tratamento laser, LED Infravermelho e LED Vermelho reduziram significativamente, a liberação de CK muscular e plasmático. A histologia mostrou uma melhora, embora parcial da mionecrose, corroborando os achados bioquímicos. Em conclusão, verificou-se que a terapia de baixa potência reduz significativamente a inflamação e a mionecrose causadas pelo veneno de *Bothrops asper*.

Palavras-chave: *Bothrops asper*, veneno, inflamação; laser.

EFFECT OF PHOTOTHERAPY ON THE INFLAMMATORY REACTION AND ON THE MYONECROSIS INDUCED BY *Bothrops asper* VENOM

Abstract

The inflammatory reaction, in the local of the bite, is a common consequence in the envenomation caused by snakes of *Bothrops* genus; this reaction can determine the loss of the affected member. The currently treatment, of *Bothrops* accidents is the soroterapy. However, this treatment is inefficient in neutralizing the local effect. In the present study, the therapeutical effect of the low power laser therapy was evaluated in the inflammatory response and mionecrose induced by *Bothrops asper* venom. For all the used protocols, animals had received irradiation with low level laser (LLL) (685 nm, 100 mW), Infrared LED (120 mW, 945 nm) and the Red LED (110 mW, 635 nm) in the times: immediately, 1 and 2 h after the application of the venom. The local inflammation was evaluated through the edema formation in muscles plantar and gastrocnemius and by leukocyte migration to peritoneal cavity of the animals. The treatments with the laser and LED had reduced by similar form the edema formation, both in plantar muscle and gastrocnemius muscle, after the application of the venom. All treatments had reduced in significant way the migration of neutrophils, 6 hours after the injection of venom. The myotoxicity activity induced by *Bothrops asper* venom was evaluated through the determination of creatine-quinase (CK) release in plasma and the gastrocnemius muscle, as well as by histological analysis, 24 hours after the injection of the venom. The results showed that the laser, Infra-red LED and Red LED treatment reduced significantly the muscular and serum CK levels. The histology showed an improvement at least in part of myonecrosis, corroborating the biochemists finding. In conclusion, it was verified that the low power therapy significantly reduces the inflammation and myonecrosis caused by *Bothrops asper* venom.

Keywords: *Bothrops asper*, venom, inflammation; laser therapy.

Lista de figuras

Figura 1 – Mapa da Região da <i>Bothrops asper</i>	14
Figura 2 – <i>Bothrops asper</i>	15
Figura 3 - Espectro Eletromagnético	20
Figura 4 - Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico	21
FIGURA 5 - Normalização da função celular, alívio da dor e cicatrização de feridas através do laser.....	23
Figura 6 - Efeitos do tratamento com laser após edema induzido por VBa.....	34
Figura 7 - Efeitos do tratamento com LED Vermelho e LED Infravermelho após o edema induzido por VBa.	35
Figura 8 - Efeitos do tratamento com laser e LED na formação do edema no músculo gastrocnêmio, nas 3 e 24 h após a injeção do veneno de VBa.	37
Figura 9 - Efeitos do tratamento com laser e LED no influxo leucocitário para a cavidade peritoneal induzida por VBa.	39
Figura 10 - Efeitos do tratamento com laser e LED na atividade CK plasmática após 24 horas da injeção i.m.....	40
Figura 11- Efeitos do tratamento com laser e LED no desenvolvimento da atividade residual CK 24 h após injeção do veneno i.m.	41
Figura 12 - Fotos indicando as secções transversais do músculo gastrocnêmio após injeção de VBa e os tratamentos.....	43

Lista de tabelas

Tabela 1 - Protocolo de irradiação com laser	28
Tabela 2 - Protocolo de irradiação com LED Vermelho	28
Tabela 3 - Protocolo de irradiação com LED Infravermelho	28

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP- (Trifosfato de Adenosina)

VBa- Veneno de *Bothrops asper*

CK – Creatinoquinase

CIVD - Coagulação Intravascular Disseminada

COX-1 - Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DE – Densidade de Energia

DP – Densidade de Potência

FLA2 - Isoformas de fosfolipase A₂

i.m.- Via intramuscular

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 β - Interleucina -1 - beta

IL-6 – Interleucina – 6

IRA – Insuficiência Renal Aguda

LBP - Laser de Baixa Potência

LED – Light Emission Diode

LED Verm – LED Vermelho

LED Infra – LED Infravermelho

LLL – Low Level Laser

LTB₄ – Leucotrieno B₄

mRNA- RNA mensageiro

PGE₂. Prostaglandina E₂

PGs - Prostaglandinas

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TXA₂ - Tromboxano A₂

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 VENENO	26
3.2 ANIMAIS.....	26
3.3 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA.....	26
3.4 IRRADIAÇÃO COM LASER	27
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA DE PATA	29
3.6 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO	29
3.7 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA.....	30
3.8 MIONECROSE.....	30
3.8.1 Análise histológica.....	30
3.8.2 Determinação dos níveis de CK plasmático e muscular	31
3.8.2.1 CK plasmático.....	31
3.8.2.2 CK muscular	31
3.9 DEXAMETASONA	32
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
3.11 SOLUÇÕES UTILIZADAS	32
3.11.1 Tampão Fosfato-Salina (PBS).....	32
3.11.2 Solução de Turk.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LASER SOBRE O EDEMA DA PATA.....	34
4.2 EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LED SOBRE O EDEMA DA PATA	35
4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LASER E LED NA FORMAÇÃO DO EDEMA NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO INDUZIDO POR VBA.....	36
4.4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DO LASER E LED NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA CAVIDADE PERITONIAL	38
4.5 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LASER E LED NA ATIVIDADE MIOTÓXICA	40
4.5.1 CK plasmático.....	40
4.5.2 CK residual.....	41
4.6 HISTOLOGIA	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A - CEP	60

1 Introdução

O maior número de acidentes ofídicos na América Latina pertence às serpentes do gênero *Bothrops*, da família Viperidae. Essas serpentes são distribuídas nas Américas, desde México até Argentina (Figura 1) (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978).

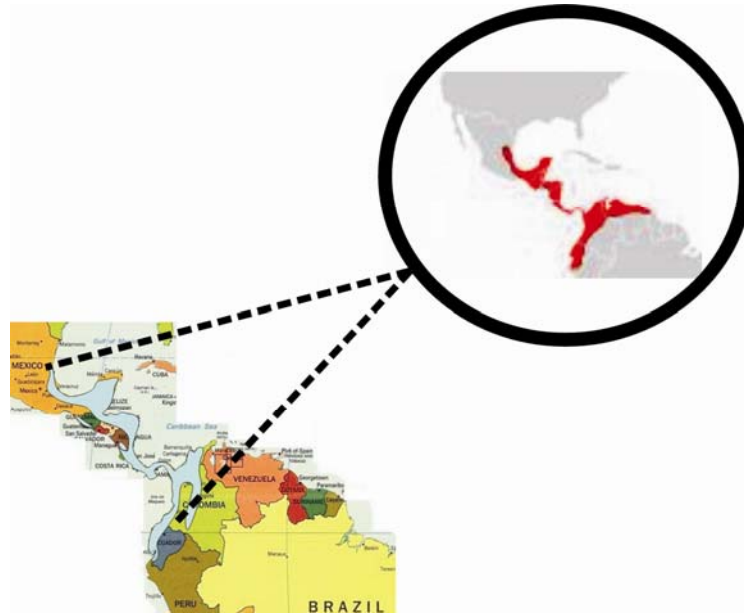


Figura 1 – Mapa da Região da *Bothrops asper*

Fonte: BOTHROPS. http://www.en.wikipedia.org/wiki/Bothrops_asper

As serpentes *Bothrops asper* são responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos na América Central. Elas são encontradas em vários tipos de habitats, muitas vezes próxima às habitações humanas. Grande e agressiva ocorre, sobretudo ao nível do mar. Têm hábitos predominantemente noturnos, ficando escondida entre as folhagens durante o dia. Elas podem avançar muito rapidamente, geralmente optam por fugirem do perigo, mas são capazes de, de repente inverter a direção vigorosamente para defender-se. Exemplares adultos, quando totalmente em alerta, devem ser considerados extremamente perigosos. Na Costa Rica, a *Bothrops asper* (vulgarmente chamado terciopelo) é responsável por quase todos os acidentes ofídicos (ARROYO et al., 1999). Além disso, muitas vítimas de picada de serpente *Bothrops asper* sofrem risco de morte devido a problemas sistêmicos e danos causados nos tecidos (JORGE et al., 1999; GUTIÉRREZ et al., 2006). Nos casos não tratados, frequentemente ocorre necrose local e pode exigir amputação.



Figura 2 – *Bothrops asper*

Fonte: BOTHROPS. http://www.en.wikipedia.org/wiki/Bothrops_asper

Os venenos de serpentes são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e peptídeos. Várias destas substâncias já analisadas demonstraram efeitos biológicos diversificados (BOLANÕS, 1984). Esta variabilidade na composição química e nas ações biológicas dos venenos pode ter caráter tanto interespecífico como intraespecífico (FURTADO et al., 1991), caracterizando as ações biológicas dos venenos de serpentes. As serpentes do gênero *Bothrops* possuem venenos com as principais ações biológicas: coagulante, hemorrágica e proteolítica:

Ação coagulante - esta ação é do tipo trombina. Através dela, o veneno pode transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina. A fração do veneno botrópico, que possui ação coagulante do tipo trombina, ativa a cascata da coagulação de maneira diferente da trombina fisiológica, não sendo neutralizada pela heparina. Além desta ação, a maioria dos venenos botrópicos é capaz de ativar o fator X (fator Stuart-Prower) e o fator II (protombina) da cascata da coagulação sanguínea. Quando há ativação do fator X, há também consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando à produção de coagulação intravascular disseminada (CIVD), com formação e deposição de microtrombos na rede capilar, o que poderia também contribuir para desencadear insuficiência renal aguda (IRA). Em última análise, ocorre ativação da cascata da coagulação, cujo resultado final será o consumo de fibrinogênio com incoagulabilidade sanguínea, restaurada horas após o tratamento adequado.

Ação hemorrágica - O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* pode causar hemorragia local ou sistêmica em nível de pulmões, cérebro e rins (PINHO; BURDMANN, 2001). A ação vasculotóxica é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente sua ruptura. O edema no local da picada, que em geral ocorre minutos após o acidente, é decorrente de lesão tóxica no endotélio dos vasos sanguíneos desse local (ROSENFELD, 1971; LOMONTE, 1994; BRASIL, 1999). A ação das hemorraginas explica muitos casos de hemorragias sistêmicas, algumas vezes fatais, no sistema nervoso central, na ausência de distúrbios da coagulação.

Ação proteolítica - decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno (proteases, hialuronidasas e fosfolipases). Pode haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares. Essa ação tem relação direta com a quantidade de veneno inoculada. As lesões locais, como rubor, edema, bolhas e necrose, são devido a essa ação, mas também decorrem da presença de hemorraginas, da ação coagulante destes venenos, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, podendo ser potencializadas por infecções secundárias (ROSENFELD, 1971; LOMONTE, 1994; BRASIL, 1999).

As vítimas proeminentes de picadas por *Bothrops asper* mostram danos nos tecidos locais caracterizados por dermonecrose, bolhas, dor, edema, hemorragia local e mionecrose (CHACUR et al., 2001; OTERO-PATIÑO et al., 2002, TEIXEIRA et al., 2003; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003; NUNEZ et al., 2004; VILLALOBOS et al., 2007) e, nos casos severos, trombocitopenia, diminuição da agregação de plaquetas, sangramento distante do sítio da picada, coagulação intravascular disseminada, choque cardiovascular e fracasso renal agudo (SABORÍO et al., 1998; OTERO-PATIÑO et al., 2002; RUCAVADO et al., 2005).

No envenenamento as alterações locais são as conseqüências mais freqüentes, pois o veneno de serpentes do gênero *Bothrops* induz a uma complexa resposta inflamatória local. (TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995, FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; BARBOSA et al., 2003). Esta reação inflamatória é caracterizada pela formação do edema e influxo leucocitário, que são mediados pela histamina, serotonina, fatores derivados do complemento, ciclo e lipo-oxigenase metabólica e citocinas.

O edema ocorre na fase inicial da resposta inflamatória e é representado pelo acúmulo de líquido no interstício causado pelo extravasamento do líquido intracelular para o espaço extracelular, devido ao aumento da pressão hidrostática e da permeabilidade vascular. O edema inflamatório apresenta-se de forma localizada e é composto de água, eletrólitos e proteínas (GARCIA LEME, 1993). O edema causado por estes venenos é relacionado, pelo menos em parte, à sua habilidade de estimular a liberação dos eicosanóides. Neste sentido, já foi demonstrado que os venenos botrópicos induzem a liberação dos eicosanóides PGE₂, TXA₂ e LTB₄, (ZAMUNER et al., 2003; CARNEIRO et al., 2004). A progressão de uma resposta inflamatória se caracteriza por um recrutamento significativo de leucócitos polimorfonucleares seguidos por células mononucleares. Os neutrófilos são recrutados rapidamente aos locais de inflamação e desempenham um papel crítico na fagocitose e eliminação através da geração de oxigênio reativo e nitrogênio intermediário e de liberação de enzimas hidrolíticas armazenadas em grânulos. Espécies reativas de oxigênio derivados de neutrófilos são conhecidas por contribuir para a lesão muscular e alterações vasculares (BUTTERFIELD et al., 2006).

Os neutrófilos podem também contribuir para a resolução das alterações teciduais causadas por vários agentes prejudiciais, tais como venenos, levando à reparação tecidual, e regeneração (TEIXEIRA et al., 2005).

Além da inflamação, a patologia local induzida pelo veneno de *Bothrops asper*, está associada à mionecrose tecidual. A miotoxicidade é uma ação específica do veneno de serpente do gênero *Bothrops* sobre o músculo esquelético, causada por substâncias denominadas miotoxinas. 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).

Soroterapia

O tratamento recomendado para o acidente ofídico é a terapia com soro polivalente feito a partir de um “pool” de venenos botrópicos. 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. Os efeitos locais podem evoluir para necrose, que dependendo da extensão, pode determinar a perda do membro afetado (ROSENFELD, 1971). Os estudos experimentais têm sugerido que existe uma significativa, embora parcial, neutralização de hemorragia, edema e mionecrose apenas quando o antiveneno é administrado imediatamente após o envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 1988; CHAVES et al. 2003; BARBOSA et al., 2008). No entanto, os mecanismos envolvidos nessa falta de proteção, não foram esclarecidos. Devido a este fato, as ações locais induzidas pelo veneno botrópico são, atualmente, um tema de intensa investigação. Embora a soroterapia seja a única abordagem terapêutica geralmente utilizada para tratar acidentes ofídicos, esse tratamento pode provocar algumas reações indesejáveis, tais como reações anafiláticas (OTERO-PATIÑO et al., 1988). Algumas alternativas foram investigadas com o objetivo de diminuir a reação local causada pelo veneno botrópico, como o uso de plantas medicinais e algumas substâncias que contém heparina e poliânions (MELO et al., 1993; LOMONTE et al., 1994; BIONDO et al., 2003; NUÑEZ et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2007). No entanto, independentemente da abordagem terapêutica disponível até ao momento, este se tem revelado ineficaz para neutralizar os efeitos locais produzidos por envenenamento causado por serpentes, que são de evolução rápida e intensa.

Outra alternativa que esta sendo investigada é a terapia a laser de baixa potência (TLBP) (DOURADO et al., 2003; BARBOSA et al., 2008; DOIN-SILVA et al., 2008). A terapia a laser de baixa potência tem sido usada clinicamente, a fim de promover efeitos antiinflamatórios, alívio de dores e aceleração da regeneração dos danos teciduais. (KANDOLF-SEKULOVIC; KATARANOSVKI; PAVLOVIC, 2003; VLADMIROV; OSI; KLEBANOV, 2004; ALBERTINI et al., 2008).

A dexametasona pertence à classe dos corticosteróides, como outros hormônios esteróides, que atuam controlando a velocidade de síntese de proteínas. Seu principal efeito se refere a uma profunda alteração na resposta imune linfocitária, representada pela ação antiinflamatória e imunossupressora, podendo prevenir ou suprimir processos inflamatórios de várias naturezas, inclusive resultantes de radiações, mecânicos, químicos e infecciosos (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Os corticosteróides inibem manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, ou seja, não só o rubor, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores

de cicatrização e reparo das feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica (RANG; DALE; RITTER, 2001).

As ações sobre os mediadores das respostas inflamatórias e imunes são: diminuição na produção de prostaglandinas; redução na síntese de citocinas; redução na concentração de componentes do complemento, redução na produção de óxido nítrico induzido; menor liberação de histamina dos basófilos; diminuição na síntese de IgG (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Laser

A palavra laser "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*", ou seja, ampliação da luz por emissão estimulada de radiação. As características que diferenciam a luz laser das outras fontes luminosas são monocromaticidade, colimação, coerência espacial e temporal. A monocromaticidade significa que a luz laser emitida apresenta apenas um único comprimento de onda, o qual é definido pelo meio ativo e pela refletividade dos espelhos do laser. A maioria dos lasers apresenta feixes colimados, isto é, com um mínimo ângulo de divergência. A coerência é a sincronicidade das ondas de luz, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo (KITCHEN; PARTRIDE, 1991; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 2002).

A interação da luz laser com o tecido é determinada por duas variáveis dependentes, comprimento de onda específico da emissão laser, e características ópticas do tecido alvo (DEDERICH, 1991 *apud* MISERENDINO; PICK, 1995). E também pelas variáveis independentes que incluem o nível de potência (densidade de potência ou irradiância); energia total entregue sobre a área da superfície irradiada (densidade de energia ou fluência); duração da exposição e o modo de entrega da energia para o tecido alvo (isto é, contínuo x pulsado; contato x não contato) (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; MISERENDINO; PICK, 1995; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 2002).

Por ser uma radiação óptica, o laser está incluído no espectro eletromagnético, tendo como intervalo espectral, mais usado na prática clínica e laboratorial, os comprimentos de onda de 630 a 1300 nm, incluindo a luz visível e a parte próxima do espectro Infravermelho, chamado de "janela terapêutica" para tecidos biológicos (BAXTER, 1997). O espectro eletromagnético pode ser observado na figura 3.

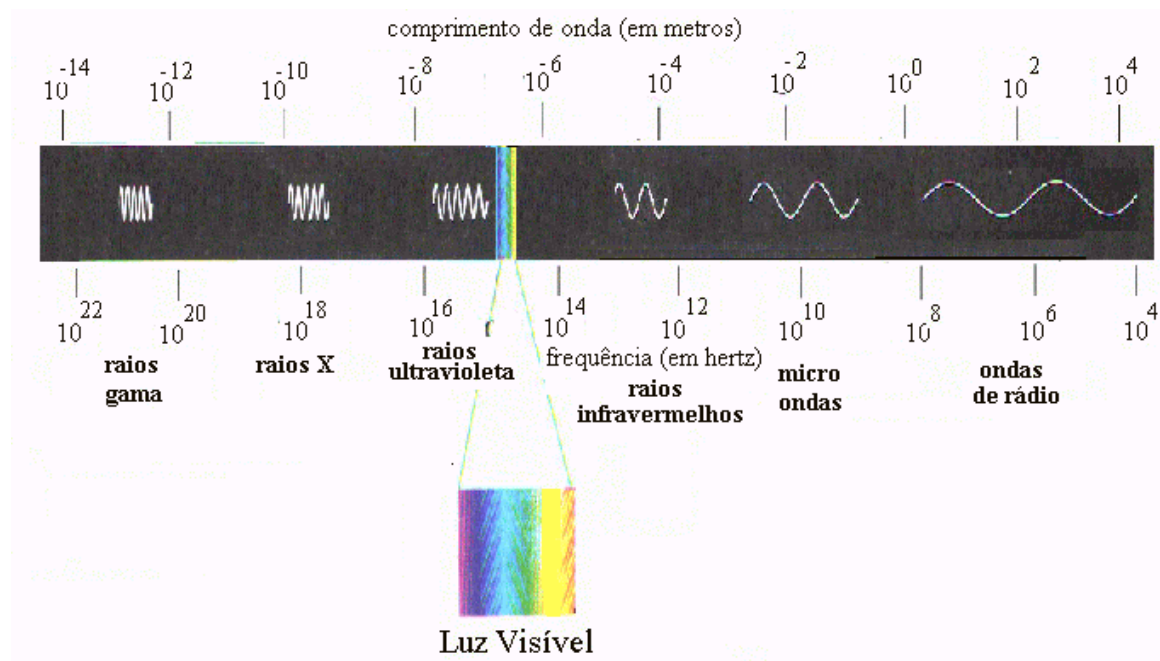


Figura 3 - Espectro Eletromagnético
 Fonte: <http://www.educar.sc.usp.br/optica/espectro.gif>

Os lasers situados na região do vermelho e do Infravermelho próximo do espectro eletromagnético são utilizados na terapia de baixa potência, os quais emitem radiações com potência inferior a 1 W, sendo assim, não possuem potencial destrutivo (BRUGNERA e PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000).

O comprimento da onda define a profundidade de penetração dos fótons no tecido. As radiações emitidas na região ultravioleta e infravermelho médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na pele, enquanto que na região Infravermelho próximo (820 nm e 840 nm) constata-se baixo coeficiente de absorção implicando em máxima penetração no tecido (KARU, 1987).

O laser fornece uma quantidade elevada de fótons que em parte, são refletidos, dispersos e transmitidos ao atingir o tecido biológico e o restante é absorvido em diferentes camadas da epiderme e da derme, de acordo com os constituintes de cada camada. Para que a radiação laser produza um efeito terapêutico no corpo humano, é necessário que ela seja absorvida para que ocorra a interação com as estruturas moleculares e celulares (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000; LOW; REED, 2001; MAILLET, 1987; VEÇOSO, 1993).

O estudo da interação entre luz laser e a matéria viva é bastante complexo; a energia depositada nos tecidos sofre fenômenos de absorção, reflexão, deflexão e transmissão. A pele é extremamente heterogênea do ponto de vista óptico e à medida que se distancia da superfície, menor é a energia absorvida (LOW; REED, 2001; TATARUNAS; MATERA; ZAIDAN, 1998) (Ver figura 4).

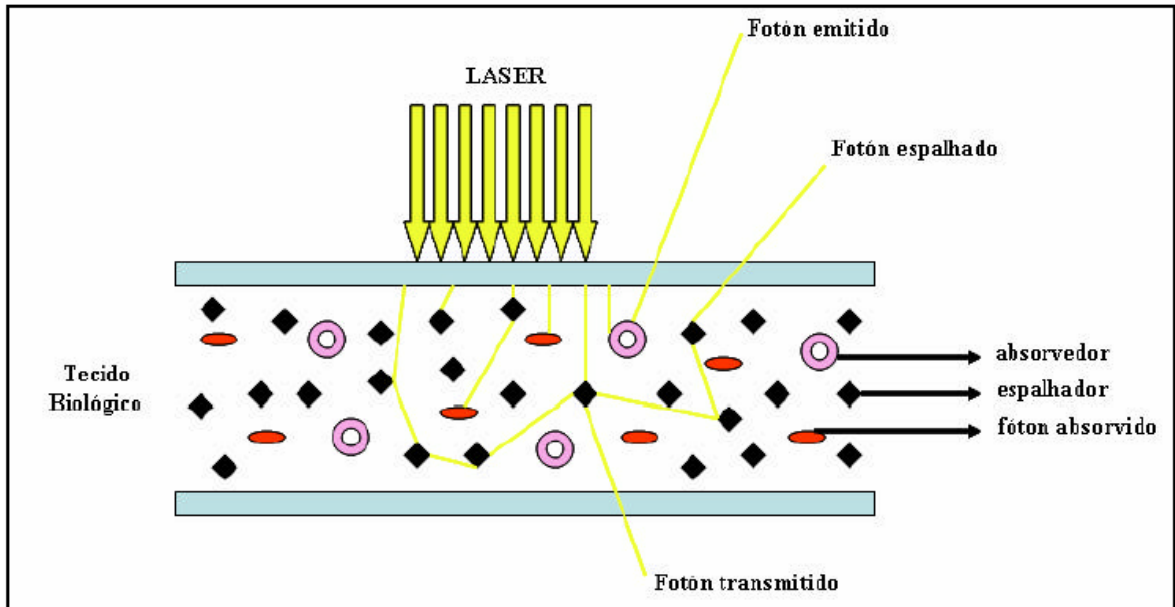


Figura 4 - Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico
Fonte: Reis (2003, p. 34)

Assim que a luz é absorvida e dispersada pelos tecidos do corpo, ocorre uma redução no efeito da radiação em relação à penetração atenuando a luz em diferentes frequências e graus. Por isso, a penetração da luz nos tecidos é determinada especialmente pelo comprimento de onda, além dos fenômenos de dispersão e absorção (BAXTER, 1997).

Elementos teciduais que apresentam alto coeficiente de absorção para um comprimento de onda específico ou espectro de energia são chamados de cromóforos, por exemplo, hemoglobina, melanina, água, os quais exercem uma influência significativa sobre a interação laser-tecido (MISERENDINO; PICK, 1995; BAXTER, 1997).

O laser gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos, fotobiológicos, afetando não só a área de atuação, mas também regiões circundantes (TUNER; HODE, 2002).

Efeitos diretos da radiação

O princípio básico da laserterapia é a capacidade de alterar o comportamento celular, na ausência de aquecimento (SCHINDL et al, 2000).

As modificações ou efeitos que ocorrem na zona irradiada ou zona circundante são chamados de efeitos primários e compreendem efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos. Esses efeitos desencadeiam outros efeitos indiretos sobre órgãos, ou mesmo efeitos terapêuticos gerais.

A irradiação laser exerce um estímulo sobre as mitocôndrias celulares provocando um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP) no interior das células e conseqüentemente aceleração da mitose. Assim, ocorrerá um aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular, eliminando as atividades anaeróbicas ocorridas em um processo inflamatório (KARU; PYATIBRAT; KALENDO, 1995; PASSARELA et al, 1984; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Estudos mostram que as células absorvem os fótons e transforma sua energia em ATP, a forma de energia utilizada pela célula. O ATP resultante é então utilizado para gerar processos metabólicos, sintetizar DNA, RNA, proteínas, enzimas e outros produtos necessários para reparar ou regenerar os componentes celulares e restaurar a homeostase (ENWEMEKA, 2007).

Uma pequena quantidade de radicais livres ou formas de oxigênio reativo é produzida como parte desse processo, e os íons cálcio (Ca^{+2}) e as enzimas da cadeia respiratória também desempenham importantes funções (Figura 5).

O incremento de ATP favorece o aporte energético para funções importantes como o transporte da membrana, síntese de proteínas e contração muscular (PASSARELA et al, 1984).

Em decorrência da energia absorvida, pode haver liberação de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, relacionadas com a dor, bem como pode modificar atividades celulares e enzimáticas, inibindo-as ou estimulando-as (BASFOR, 1995; CAMPANA; MOYA, 1999).

Outro efeito é a ação fibrinolítica, que auxilia na redução do edema já instalado (RICCI, 2003).

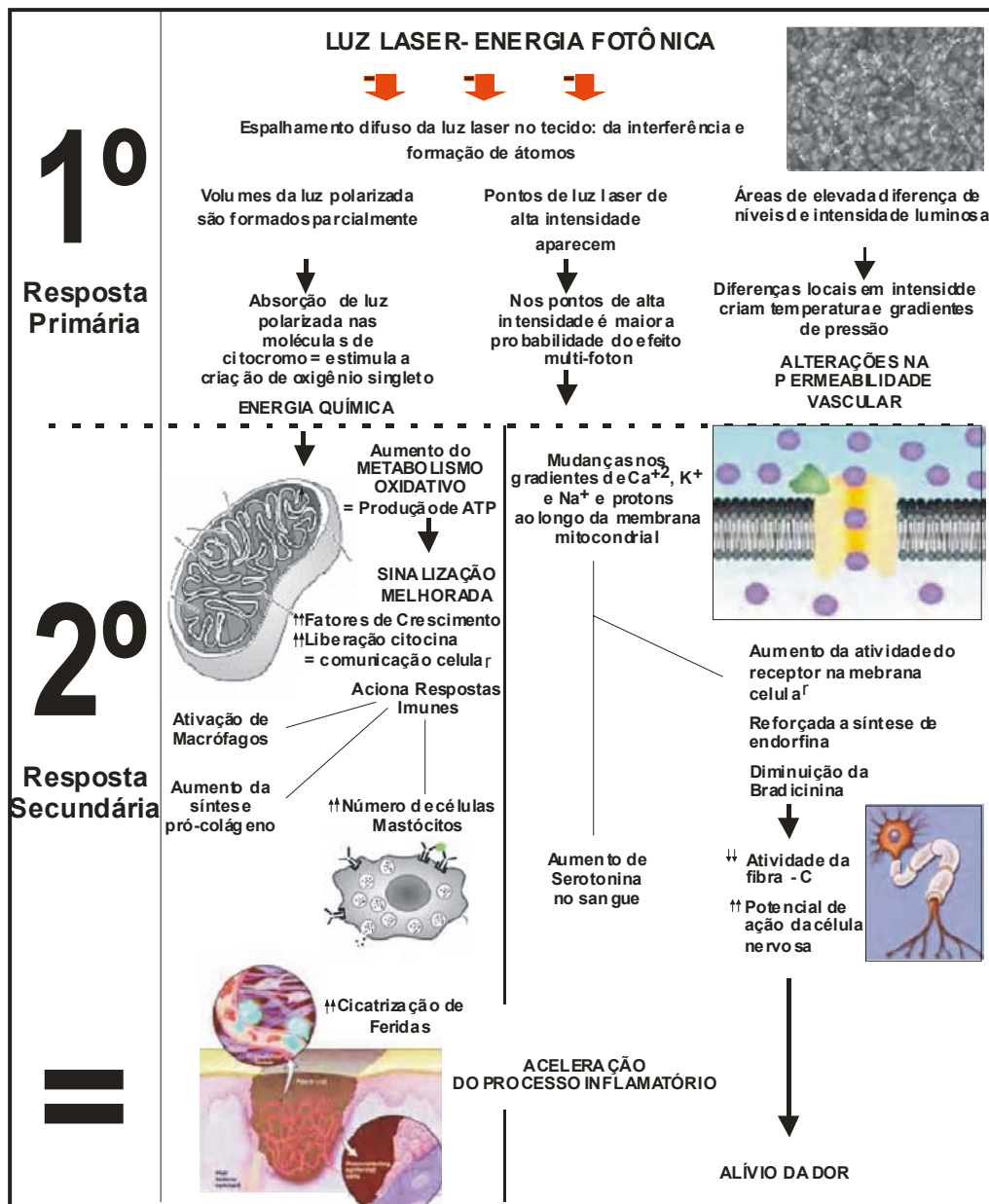


Figura 5 - Os mecanismos primários dizem respeito à interação entre os fótons e moléculas em tecido, enquanto que os mecanismos secundários referem-se ao efeito das alterações químicas induzidas pelos efeitos primários. A estimulação da produção de ATP celular tem sido apontada como um dos efeitos mais importantes da terapia a laser. Os mecanismos secundários incluem efeito sobre a dor, efeito sobre a circulação sanguínea, efeito sobre mecanismos estimuladores e reguladores e os efeitos sobre o sistema imunitário. Adaptado e modificado a partir do texto original de Tuner e Hode (2002).

LED

O LED (Light Emitting Diode) é um diodo emissor de luz, que quando energizado emite luz monocromática e não coerente. É uma luz com alto grau de pureza que permite a sua utilização sem que haja a necessidade de filtros ópticos coletores. São dispositivos

semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal, conduzir a corrente elétrica em um único sentido, (MEDEIROS, 2001). Quando polarizados adequadamente esses dispositivos semicondutores emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes (ZANIN et al, 2005).

O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica é denominado “eletroluminescência”. A luz emitida se dá devido ao diodo energizado (REBELLO, 2005).

Segundo alguns autores, a terapia com LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a terapia laser de baixa potência. O aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz. O processo de absorção luminosa por um cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir um pacote energético específico para que promova reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras de luz (KARU, 2003).

Atualmente os LEDs estão sendo investigados na área biológica como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência (LBP), tendo em vista o seu baixo custo, praticidade e baixo consumo de energia (KARU, 2006; ANDRADE et al, 2001).

Ainda que vários estudos atestem o efeito benéfico da terapia com LED, nenhum estudo sobre envenenamento botrópico, tratada com LED, foi publicado em revista especializada até o momento. O desenvolvimento desta terapia poderia contribuir nos sistemas de saúde públicos e particulares, otimizando o processo de reabilitação de pacientes através de uma terapia de baixo custo.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais visam estudar os efeitos da fototerapia na reação inflamatória e mionecrose induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops asper*.

2.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos do laser e LED, após a injeção do veneno de *Bothrops asper*, no que se refere a:

- formação do edema podal;
- migração de células para o peritônio dos animais;
- mionecrose no músculo gastrocnêmio;
- liberação de CK no músculo gastrocnêmio e no plasma.

3 Material e métodos

3.1 Veneno

Venenos brutos liofilizados de *Bothrops asper* (VBa) foram fornecidos pelo Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica. Os venenos foram dissolvidos em solução salina 0,9% apenas no momento do uso.

3.2 Animais

A realização da presente pesquisa científica seguiu as normas e os registros da Resolução CNS 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e só foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP (Universidade do Vale do Paraíba) sob o número A118/2007/CEP.

Foram camundongos Swiss machos adultos (22 - 25 g) (45 dias de idade) obtidos a partir da ANILAB (Animais de Laboratório), Paulínia, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com água e comida *ad libitum* e mantidos sob temperaturas controladas (26°C) e um ciclo de 12 h claro/escuro.

3.3 Protocolo de eutanásia

Os animais foram mortos com anestésicos 10 mg/kg de Xilazin (Virbaxyl 2%; 0,1 mg/kg ip) + 100 mg/kg de cetamina (Dopalen; 1 mL/kg ip). Após o efeito do anestésico, foi administrada overdose de Cloreto de Potássio a 10% (intracardíaco) (FLECKNELL, 2000).

3.4 Irradiação com laser

O tratamento foi realizado com a utilização do laser de baixa potência, semiconductor, (modelo Theralase DMC, São Carlos, SP, Brasil) e com o LED confeccionado no Laboratório de Instrumentação Optobiomédica do Instituto de Pesquisa da Univap, ambos os aparelhos foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Carlos José de Lima. Os parâmetros do laser e do LED estão demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3.

Para a realização da irradiação, os grupos de animais foram posicionados em uma mesa em decúbito dorsal e a pata imobilizada manualmente onde o laser e o LED foram aplicados perpendicularmente, na região onde foi injetado o veneno, após tricotomia local e anti-sepsia. O grupo controle recebeu o mesmo procedimento experimental, porém com o laser desligado. A distância de aplicação do laser e LED foram estimadas em uma média de 15 mm, no mesmo local da injeção. A potência do laser e LED foram calibradas utilizando um calibrador Newport Multifuncionais Optical Meter (modelo 1835C). A irradiação foi aplicada imediatamente 1 e 2 horas após a inoculação VBa. As doses do tratamento com o laser ou LED, para a realização deste trabalho, baixas o suficientes para evitar supostos efeitos térmicos, foram escolhidas com base em estudos anteriores que haviam mostrado um efeito benéfico do laser de baixa potência no processo inflamatório (ALBERTINI et al., 2007; BARBOSA et al., 2008).

Tabela 1 - Protocolo de irradiação com laser

PARÂMETROS	VALORES
Densidade de Energia (DE)	4 J/cm ²
Potência	100 mW
Tempo	1,55 s
Área Irradiada	0,2 cm ²
Comprimento de onda	685 nm

Tabela 2 - Protocolo de irradiação com LED Vermelho

PARÂMETROS	VALORES
Densidade de Energia (DE)	4 J/cm ²
Potência	110 mW
Tempo	41 s
Área Irradiada	0,2 cm ²
Comprimento de onda	635 nm

Tabela 3 - Protocolo de Irradiação com LED Infravermelho

PARÂMETROS	VALORES
Densidade de Energia (DE)	4 J/cm ²
Potência	120 mW
Tempo	38 s
Área Irradiada	0,2 cm ²
Comprimento de onda	945 nm

3.5 Quantificação do Edema de pata

A capacidade do laser e LED em reduzir a formação de edema foi estudada em camundongos. Para tanto, 50 µL de solução salina estéril 0.9% (w/v) contendo veneno (2,5 µg/pata) foram injetados na região subplantar da pata posterior direita. A pata posterior esquerda recebeu um volume igual e constante de solução salina estéril e serviu de controle. O volume de ambas as patas posteriores foram medidos por pletismografia (modelo 7140 Plethysmometer, Ugo Basile, Itália) aos 30 min, 1, 2, 4 e 6 h após a administração do veneno, de acordo com Van Arman et al., (1965). O efeito edematogênico foi expresso como a porcentagem de aumento no volume do tratado (à direita) em relação à pata controle (esquerda) em cada intervalo. Os animais foram sacrificados 6 horas após a injeção de veneno. O volume das patas foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de aumento do volume podal} = \frac{\textit{Volume Final} - \textit{Volume Inicial} \times 100}{\textit{Volume Inicial}}$$

3.6 Quantificação do edema no músculo gastrocnêmio

O VBa foi dissolvido em 50 µL de solução salina estéril e injetado no músculo gastrocnêmio direito na concentração de 50 µg/animal. O músculo contralateral recebeu igual volume de solução salina estéril. Para a quantificação do edema foi feita a retirada do músculo gastrocnêmio de ambas as pernas. O edema foi medido no tecido muscular pela quantificação do peso muscular molhado, 3 e 24 horas após injeção de Vba, o qual foi expresso como porcentagem do aumento no peso do músculo injetado, comparado com o músculo contralateral (controle) (TEIXEIRA et al., 2003).

3.7 Migração leucocitária

O infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal foi avaliado no tempo de 6 h após a injeção do veneno (5 µg/cavidade) (ZAMUNER et al, 2005). Leucócitos foram colhidos por lavagem da cavidade com 2 mL de salina contendo heparina (10 U/mL). Alíquotas das lavagens foram coletadas e utilizadas para determinar a contagem total de células em câmara de Neubauer, após a diluição (1:20 v/v) em solução de Turk (0,2% cristal violeta corado em 30% em ácido acético). A contagem dos leucócitos diferenciais foi realizada em Kit Instant Prov e foram realizados pela contagem de pelo menos 100 células, as quais foram classificadas como células polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios morfológicos convencionais.

3.8 Mionecrose

Para a indução da mionecrose, o VBa foi dissolvido em 50 µL de solução salina estéril e injetado no músculo gastrocnêmio direito, após tricotomia local e anti-sepsia, na concentração de 50 µg. O músculo contralateral recebeu igual volume de solução salina estéril. Os animais foram mortos com uma overdose de anestésicos, 24 horas após a administração do veneno. O músculo gastrocnêmio foi retirado e processado para posterior análise bioquímica e histológica. (TEIXEIRA et al, 2003).

3.8.1 Análise histológica

O músculo gastrocnêmio foi retirado após 24 h da injeção do veneno ou salina e foram fixados em solução de formol 10% e processados para posterior análise histológica. Após a fixação, os músculos foram desidratados e incluídos em historesina Leika (NuBloch/Heidelberg, Alemanha); em seguida foram confeccionados os blocos; estes foram cortados em micrótomo Leika RM 2035 e as secções (3 µm de espessura) foram montadas em lâminas, coradas com Hematoxilina e Eosina (H/E) e analisadas em microscópio Medilux 0758490. Após a análise histopatológica dos músculos, procedeu-se a documentação dos resultados obtidos através de fotografias tiradas em fotomicroscópio Zeiss AXIOPHOT. (ZAMUNER et al, 2004).

3.8.2 Determinação dos níveis de CK plasmático e muscular

Foram determinados os níveis de:

3.8.2.1 CK plasmático

Camundongos receberam injeção de 50 µg de VBa no músculo gastrocnêmio direito e igual volume de solução salina no músculo controle. A miotoxicidade é relatada como um aumento na atividade do CK plasmático. Amostras de sangue foram coletadas 3 horas após a injeção veneno. O soro foi separado e armazenado a 4°C para posterior determinação da atividade do CK do plasma utilizando um Kit diagnóstico (Merck Diagnóstico, São Paulo, SP, Brasil). A atividade de CK plasmático foi expressa em U/L, uma unidade definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de NADH por minuto nas condições do ensaio. A atividade basal do CK plasmático foi obtida em amostras de sangue coletadas de cada grupo antes da injeção do veneno ou solução salina. (CALIL-ELIAS et al., 2002).

3.8.2.2 CK muscular

Os músculos gastrocnêmicos foram injetados com VBa (50µg) retirados e homogeneizados em 4 mL de PBS (tampão fosfato salina). A homogeneização foi realizada (homogeinizadora Polytron, Lucerna, Suíça) durante 10 segundos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS contendo 0,5% Triton X-100. Os homogenatos foram centrifugados a 5000 g durante 5 min, e o sobrenadante foi diluído 1:35, v/v, com PBS para a quantificação do CK. A atividade de CK no músculo tem sido usada como um índice quantitativo da regeneração muscular (GUTIÉRREZ et al., 1986, TEIXEIRA et al., 2003/2005). A atividade de CK foi determinada através do Kit diagnóstico (LABTEST CK-NAC). A leitura foi feita através de espectrofotômetro (Spectra MAX, λ190 a 340 nm) e foi expressa em U/L, uma unidade definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de NADH por minuto nas condições do ensaio.

3.9 Dexametasona

A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório, administrada na dose de 4 mg/kg (OSLON et al., 1985; ROGERS, JEFFREY, 1986), via i.p., 1 hora antes da injeção dos venenos.

3.10 Análise estatística

A média e desvio padrão foram calculados para cada grupo. Para estabelecer se a diferença entre os valores médios dos grupos experimentais foi significativa o teste ANOVA foi realizado seguido por um teste Tukey-Kramer, utilizando-se um nível de significância estatística $p < 0,05$.

3.11 Soluções utilizadas

3.11.1 Tampão Fosfato-Salina (PBS)

Solução estoque de Salina

NaCl	81,82 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução Salina (0,9 %)

Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	900 mL

Solução estoque de Fosfato

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	3,58 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{12H}_2\text{O}$	26,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução Fosfato-Salina

Solução estoque de Fosfato	100 mL
Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	800 mL

3.11.2 Solução de Turk

Ácido acético glacial	1 mL
Violeta genciana 1%	1 mL
Água destilada	q.s.p. 100 mL

4 Resultados

4.1 Efeitos da aplicação do laser sobre o edema da pata

A injeção de 2,5 µg/pata de VBa causou um proeminente aumento do edema após injeção, em comparação a pata contralateral. O aumento do edema ocorreu imediatamente chegando ao pico máximo 1 h após a injeção do veneno e diminuiu gradativamente após 6 h. A capacidade do laser em diminuir a formação do edema induzido por VBa foi comparada com a dexametasona. A figura 6 mostra que, no pico de formação de edema, este foi reduzido significativamente em 52% e 66% para o laser e a dexametasona, respectivamente.

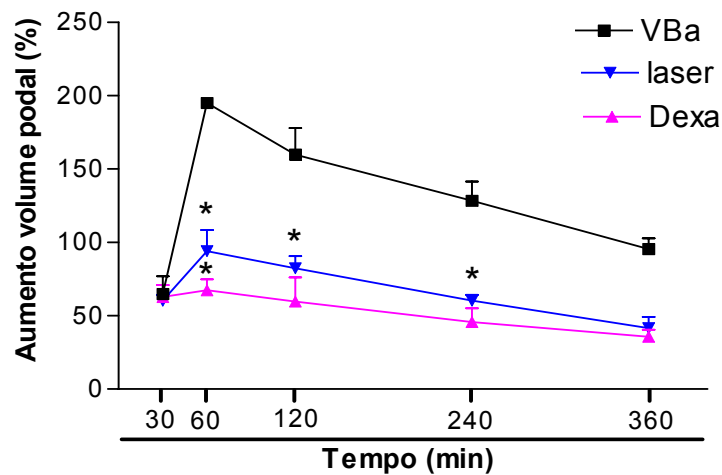


Figura 6 - Efeitos do tratamento com laser e dexametasona após edema induzido por VBa. Camundongos foram injetados i.m. no coxim plantar com 2,5 µg/pata de VBa dissolvido em 50 µL de solução salina. Os grupos receberam tratamentos com irradiação nos seguintes tempos: imediatamente, 1 e 2 h após a inoculação do veneno. A dexametasona foi administrada 1 h antes da injeção do veneno. O aumento do volume podal foi avaliado nos tempos: 30, 60, 120, 240 e 360 min após estímulo lesivo. Todos os animais foram sacrificados após 6 h. O edema foi mostrado em porcentagem do aumento em relação ao volume inicial da pata. Cada ponto representa a média ± SEM de 5 animais. *p<0.05 comparado com o grupo VBa.

4.2 Efeitos da aplicação do LED sobre o edema da pata

Para determinar se o LED teria a mesma eficácia do laser em reduzir a formação do edema induzido pelo veneno de VBa, foram realizados experimentos utilizando os LEDs vermelho e Infravermelho, nos mesmos parâmetros utilizados para o laser. Tanto o LED vermelho como o LED Infravermelho foram capazes de reduzir a formação do edema podal em 70% e 52%, respectivamente (fig. 7).

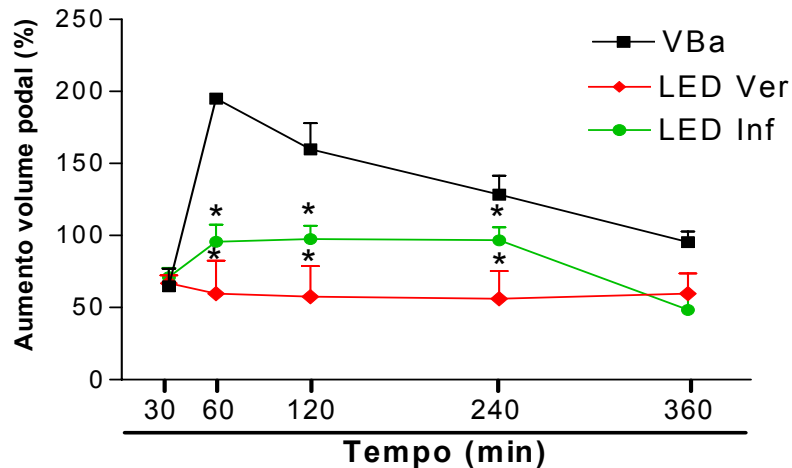


Figura 7 - Efeitos do tratamento com LED Vermelho e LED Infravermelho após o edema induzido por Vba. Camundongos foram injetados no coxim plantar com 2,5 μg /pata de VBa dissolvido em 50 μL solução salina. Os grupos receberam tratamentos com irradiação nos seguintes tempos: imediatamente, 1 e 2 h após a inoculação do veneno. Todos os animais foram sacrificados após 6 h. O aumento do volume podal foi avaliado nos seguintes tempos: 30, 60, 120, 240 e 360 min após a injeção do VBa. O edema foi mostrado em porcentagem do aumento em relação ao volume inicial da pata. Cada ponto representa a média \pm SEM por 5 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo VBa.

4.3 Efeitos do tratamento com laser e LED na formação do edema no músculo gastrocnêmio induzido por VBa

A injeção intramuscular de 50 µg de VBa causou um proeminente aumento do edema do músculo gastrocnêmio, às 3 h, bem como às 24 h após a injeção do veneno, em comparação com o controle injetado com salina. Pode-se observar que o tratamento com o laser reduziu em 38 % e 67 % o edema induzido pelo veneno para ambas, 3 e 24 h, respectivamente. O LED Infravermelho causou uma diminuição significativa, em 24 horas de 86 % e as 3 horas diminuiu significativamente o edema em 64 % e o LED Vermelho obteve praticamente o mesmo efeito as 3 e 24 horas tendo reduzido o edema muscular em: 60 % e 61 %, respectivamente.

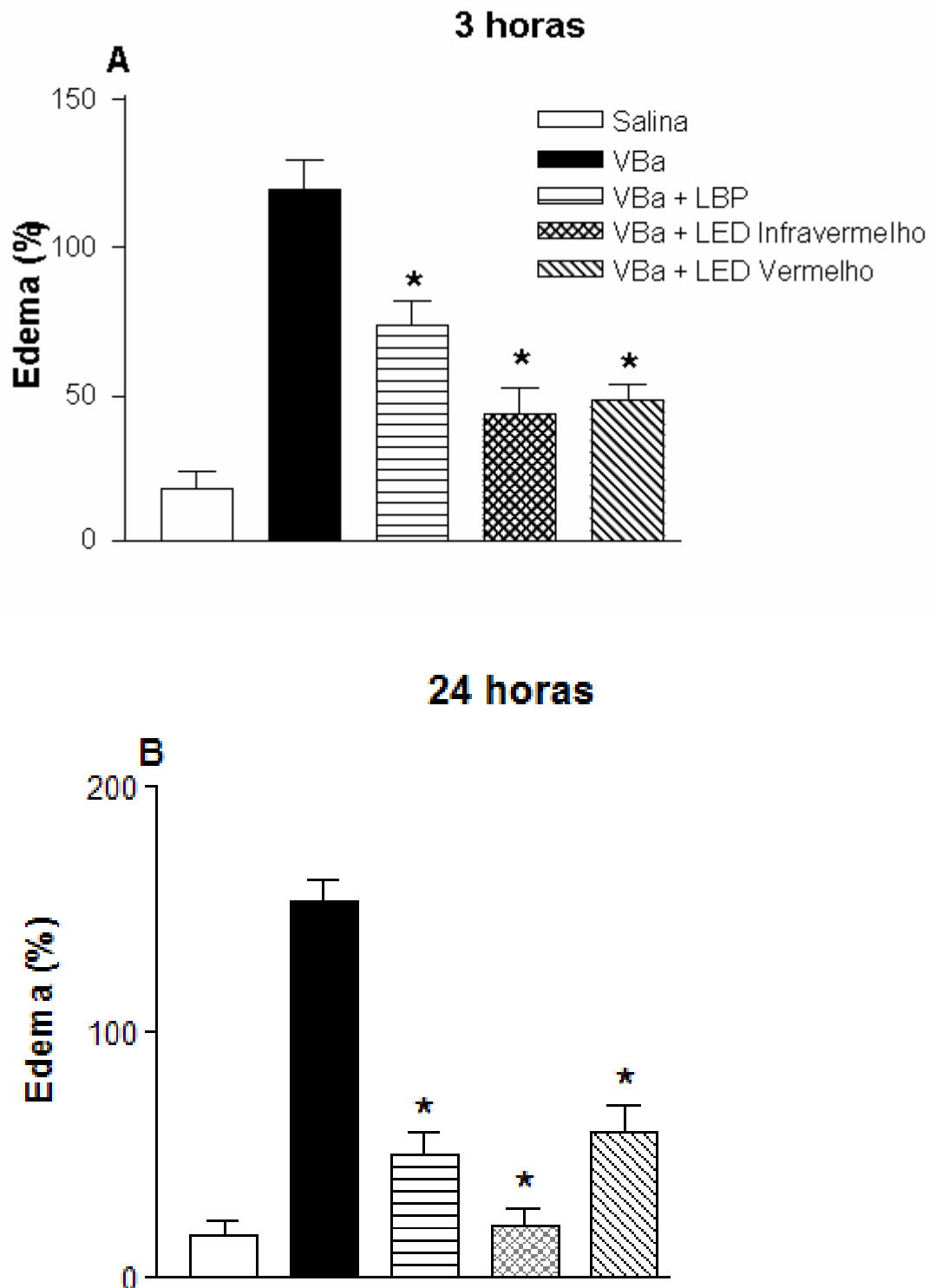


Figura 8 - Efeitos do tratamento com laser e LED na formação do edema no músculo gastrocnêmio, nas 3 e 24 h após a injeção de VBa: VBa foi injetado no músculo gastrocnêmio direito, o músculo esquerdo (controle) recebeu igual volume de solução salina apirogênica. Os grupos receberam tratamentos com irradiação nos seguintes tempos: imediatamente, 1 e 2 h após a inoculação do veneno. Para a quantificação do edema foi feita a retirada do músculo gastrocnêmio de ambas as pernas. O edema foi medido no tecido muscular pela quantificação do peso muscular molhado, o qual foi expresso como porcentagem de aumento no peso do músculo injetado, comparado com o músculo contralateral. Cada ponto representa a média \pm SEM por 5 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo VBa.

4.4 Efeitos da aplicação do laser e LED no infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal

O número de leucócitos na cavidade peritoneal foi determinada 6 h após a injeção (50 µg/cavidade) de VBa (Figura 9). O tratamento com o laser reduziu de forma significativa o número de leucócitos totais ($2590.0 \pm 298.0 \times 10^3/\text{mL}$; $3810.0 \pm 245.10 \times 10^3/\text{mL}$ - veneno) (Figura 9A). A contagem diferencial mostrou que as células presentes na cavidade peritoneal eram predominantemente polimorfonucleares (Figura 9B). A redução foi mais notável para os polimorfonucleares (B) após aplicação do LED Infravermelho. Por outro lado, o número de células mononucleares, não é modificado em nenhum dos tratamentos utilizados.

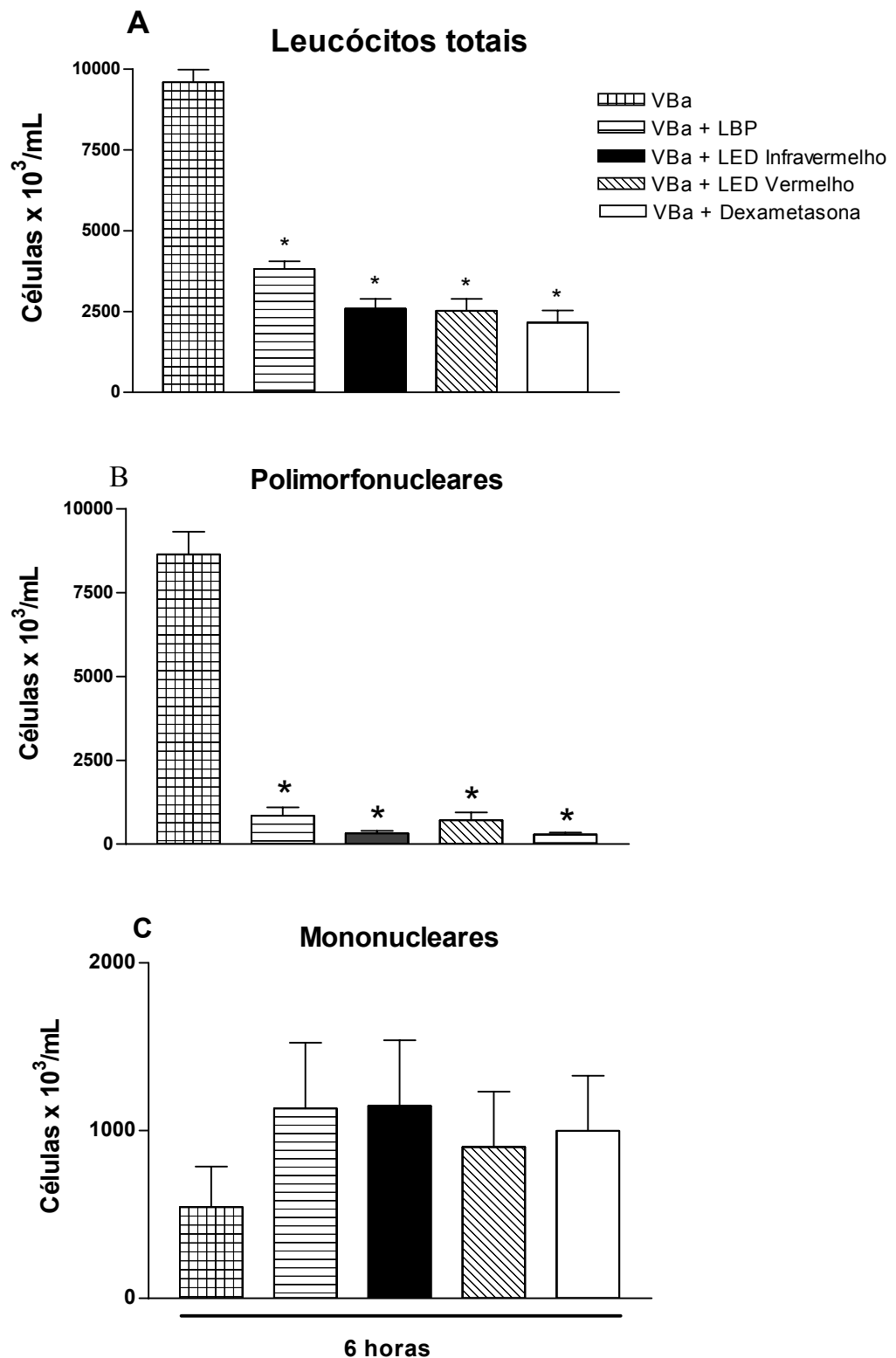


Figura 9 - Efeito do laser e LED no influxo leucocitário para a cavidade peritoneal induzida por VBa: (A) Total de leucócitos, (B) células polimorfonucleares, (C) células mononucleares. Os grupos receberam 3 sessões de laser e LED (imediatamente, 1 e 2 horas) após a injeção do veneno. Após 6 h os grupos de animais foram sacrificados e os exsudatos inflamatórios foram retirados após a lavagem da cavidade peritoneal, conforme material e métodos. Cada ponto representa a média \pm SEM por 5 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo VBa.

4.5 Efeitos do tratamento com laser e LED na atividade miotóxica

A atividade miotóxica do veneno foi avaliada através da injeção intramuscular de 50 µg de VBa e determinação através da liberação de creatino-quinase (CK) no plasma e no músculo gastrocnêmio.

4.5.1 CK plasmático

O veneno de VBa causou uma liberação de CK no plasma dos animais de $221,50 \pm 29$ U/L. Como mostrado na Figura 10, houve uma redução significativa nos níveis plasmáticos de CK, em comparação ao grupo veneno, com o LED Infravermelho ($35,60 \pm 10,70$ U/L) seguido pelo LED Vermelho ($66,90 \pm 51,90$ U/L) e Laser ($81,40 \pm 44,0$ U/L).

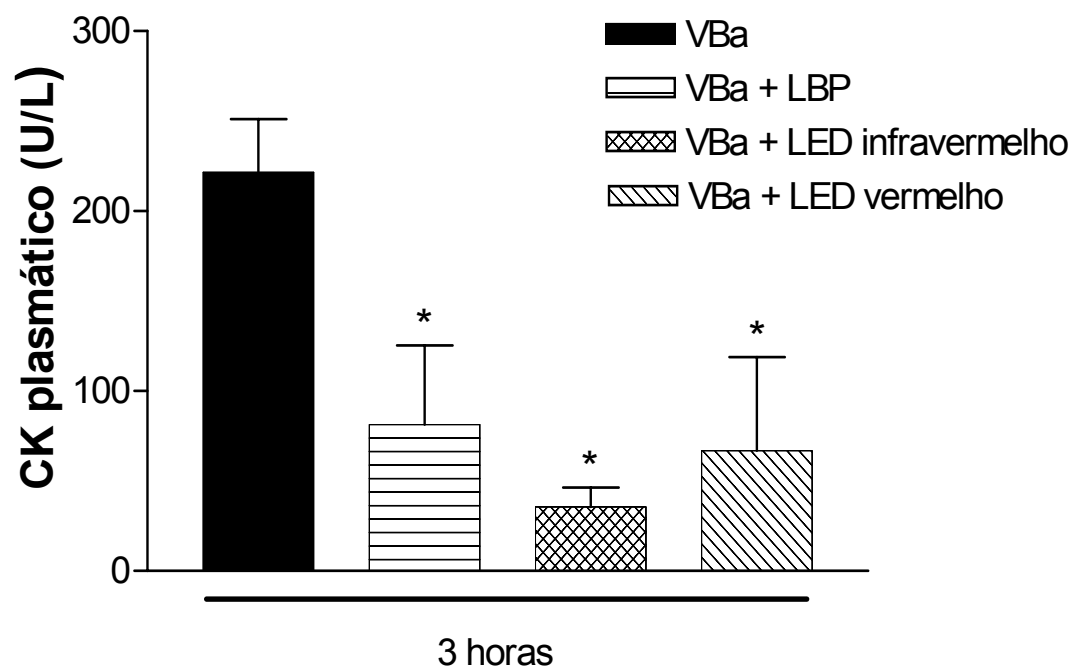


Figura 10 - Efeitos do tratamento com laser e LED na atividade CK plasmática após 24 horas da injeção i.m. Camundongos foram injetados no músculo gastrocnêmio direito com 50 µg de VBa, dissolvido em 50 µL de solução salina. Os grupos receberam irradiação imediatamente e novamente 1 h e 2 horas após a inoculação do veneno, e foram sacrificados após 24 horas. O resultado foi expresso em unidades (U/L), onde uma unidade correspondente à fosforilação de 1 nmol de NADH, em 25°C. * $P < 0,05$ versus o grupo de veneno correspondente.

4.5.2 CK residual

O VBa causou liberação de CK no músculo gastrocnêmio, 24 h após injeção do veneno, em comparação ao músculo controle. Os tratamentos: Laser (1928.70 ± 265.80 U/L), LED Infravermelho (1642.20 ± 255.40 U/L) e LED vermelho (1415.00 ± 81.50 U/L) reduziram significativamente a mionecrose nas 24 h respectivamente. (Fig.11).

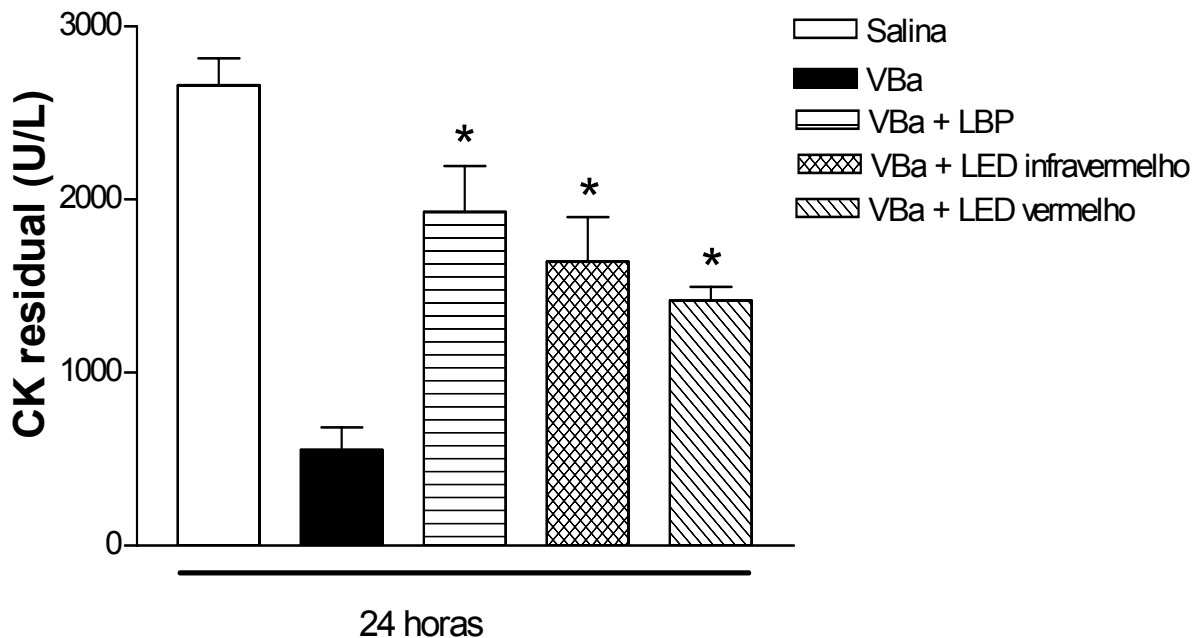


Figura 11 - Efeitos do tratamento com laser e LED no desenvolvimento da atividade residual CK 24 h após injeção do veneno i.m.: VBa foi dissolvido em 50 μ L de solução salina e injetado no músculo gastrocnêmio direito (de 50 μ g). O músculo contralateral recebeu igual volume de solução salina. Os animais foram mortos com uma overdose de anestésicos nas 24 horas após a administração do veneno. Os grupos receberam tratamento com irradiação imediatamente, 1 e 2 h após inoculação do veneno. Ambos os músculos gastrocnêmios direito e esquerdo, foram dissecados e homogeneizados. O resultado foi expresso em unidades (U/L), onde uma unidade correspondente à fosforilação de 1 nmol de NADH, em 25°C. * $P < 0,05$ versus o grupo de veneno correspondente.

4.6 Histologia

As alterações locais induzidas por VBa em 24 h são ilustradas na Figura 12. A foto ilustrando o controle muscular mostra estrutura normal das secções transversais das células, com fibras musculares e com fascículos musculares definidos, e membranas íntegras (A - salina). A Figura 12 (B), mostra alterações significativas do músculo gastrocnêmio após 24 h de inoculação de VBa, incluindo perda da definição dos fascículos musculares e uma progressiva infiltração de células inflamatórias. O laser está representado na Figura 12 (C), A Figura 12 (D) é a que mostra melhor recuperação das células lesadas por VBa, representada pelo LED Infravermelho e a Figura 12 (E) que mostra o músculo após o LED Vermelho, é menor a diminuição do infiltrado inflamatório e conseqüentemente das fibras lesadas.

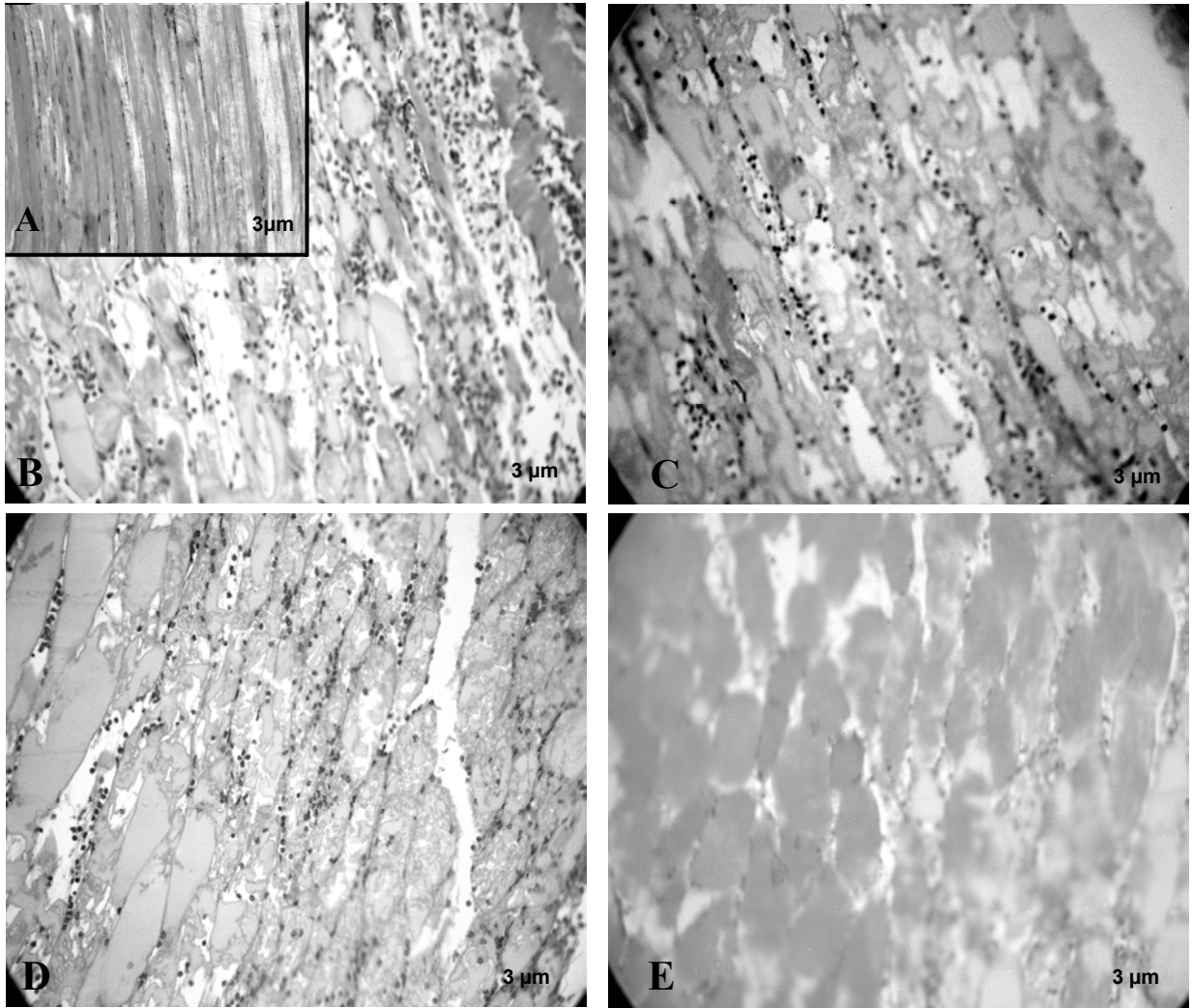


Figura 12 – Lâminas de secções transversais do músculo gastrocnêmio: (A) salina, (B) VBa, (C) LBP, (D), LED Infravermelho, (E) LED Vermelho. A comparação com o controle mostrou que o LED Infravermelho foi o mais eficiente na recuperação das células lesadas.

5 Discussão

Antivenenos constituem o mais importante recurso terapêutico para envenenamento por picada de serpente no Brasil e demais países da América Central. Embora o antiveneno seja a única abordagem terapêutica utilizada para tratar acidentes ofídicos, não neutraliza os efeitos locais induzidos pelo veneno botrópico (PICOLO et al., 2002; ZAMUNER et al., 2004; BARBOSA et al., 2008). O antiveneno comumente utilizado para a soroterapia de picada de serpentes mostra uma eficácia limitada na neutralização do edema, não só devido à variedade de componentes induzindo esta alteração, mas também devido ao seu rápido início (OTERO-PATIÑO et al., 1998; LOMONTE et al., 1993). Um número crescente de compostos naturais e sintéticos tem sido relatado por ter efeitos inibidores sobre miotoxinas dos venenos, tais como a heparina (LOMONTE et al., 1994), suramin (MURAKAMI et al., 2005), fucoidan (ÂNGULO; LOMONTE, 2003; AZOFEIFA et al., 2008), fatores de soro animal (FORTES-DIAS, 2002; LIZANO et al., 2003) e uma ampla variedade de componentes de plantas (SOARES et al., 2005; DA SILVA et al., 2007). Contudo, até o momento, não existe um consenso para o tratamento mais adequado para diminuir ou mesmo neutralizar os efeitos locais causadas por veneno de serpentes botrópicas. Por este motivo, pesquisadores têm buscado cada vez mais alternativas para o tratamento do efeito local induzido pelo veneno botrópico, destacando-se a reação inflamatória e a mionecrose.

A reação inflamatória é um dos mais importantes eventos de envenenamento provocado pela serpente *Bothrops asper* (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993; CHAVES et al., 2005). O aumento da permeabilidade vascular e edema estão entre as primeiras manifestações na resposta inflamatória seguido por infiltração de leucócitos (VANE, 1993). Em picada de serpentes botrópicas, o edema é o resultado da síntese de potentes autacoides ou eicosanóides desencadeados por componentes enzimáticos do veneno, bem como pelos danos na microvasculatura com extravasamento de plasma e na liberação de citocinas (NUÑEZ et al., 2004).

Neste estudo a formação do edema induzido por VBa, tanto no músculo plantar quanto no músculo gastrocnêmio foi reduzida significativamente, para todos os tratamentos utilizados: a terapia laser, LED Infravermelho e LED Vermelho, se comparados com os grupos que haviam recebido apenas veneno. Este resultado corrobora os resultados de Bertone et al., (2008) que mostrou que a terapia a laser administrada 1 h após a injeção de carragenina foi capaz de promover a redução do edema da pata. Ainda, a terapia a laser foi eficaz na

redução do edema no músculo gastrocnêmio, após injeção de *Bothrops jararacussu* (Barbosa et al., 2008). Em estudos experimentais de 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. Ainda, de acordo com a literatura, a terapia a laser age reduzindo os níveis de PGE₂ e a expressão de COX-2 (SHIMIZU et al., 1995; CAMPANA et al., 1998). Portanto, podemos sugerir que, o laser age por reduzir os níveis de PGE₂ induzido pelo veneno, e assim diminuir a formação de edema, embora esta hipótese ainda requeira estudos adicionais. Apesar da literatura não apresentar dados mostrando a capacidade do LED na redução de edema, nossos estudos mostraram que este reduziu significativamente o edema induzido por VBa de maneira semelhante ao laser.

Outro evento importante da resposta inflamatória é a migração de leucócitos para o foco inflamatório. Leucócitos circulantes - neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos – migram, seletivamente e em número significativo, para o tecido inflamado (ALBELDA et al., 1994). Nos estágios iniciais de uma resposta inflamatória aguda, há acúmulo predominante de neutrófilos (ISSEKUTZ et al., 1980). Estas células representam a primeira linha de defesa do organismo e apresentam uma alta capacidade fagocítica e microbicida para a eliminação e/ou neutralização do agente agressor. Neste sentido, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares infiltrados no local da inoculação de venenos botrópicos foram previamente relatados na literatura (TEIXEIRA et al., 2003, 2005; GUTIÉRREZ et al., 1986; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; SAFAVI et al., 2007).

Na presente investigação, todos os tratamentos utilizados foram eficientes em reduzir o acúmulo de leucócitos, induzido pela injeção do VBa, na cavidade peritoneal de camundongos. A redução de leucócitos foi efetiva para todos os tratamentos, porém a terapia que se mostrou mais efetiva após aplicação foi o LED Infravermelho. A terapia laser já tinha sido demonstrada *in vivo*, quanto a sua capacidade de redução do influxo de leucócitos no músculo gastrocnêmio após a injeção do veneno *Bothrops jararacussu* (BARBOSA et al., 2008).

A literatura mostra que a terapia de baixa potência reverte o efeito inflamatório e reduz significativamente a expressão de IL-1 β e IFN- γ (SAFAVI et al., 2007). Ademais, em modelo experimental de edema de pata em rato, a expressão de mRNA para as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, no músculo plantar de ratos, esta diminuída após o tratamento com o laser de baixa potência (ALBERTINI et al., 2008). Neste sentido, foi demonstrado que o

veneno de *B. asper* é capaz de induzir a liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ (ZAMUNER et al., 2001; 2005), assim, é possível que no nosso modelo experimental, a terapia com o laser e LED de baixa potência modulou negativamente a ação de mediadores pró-inflamatórios, importantes para o recrutamento dessas células, e dessa forma, reduzindo o influxo de células inflamatórias para o local da injeção do veneno.

A mionecrose é um efeito proeminente do envenenamento causado por veneno de serpentes *Bothrops asper* e a consequência é a perda da massa muscular com dificuldade de regeneração (LOMONTE et al., 2003; ZAMUNER et al., 2004). A capacidade da terapia laser e LED em reduzir a mionecrose causada pelo VBa foi avaliada pelas técnicas bioquímica e histológica. A análise de histologia evidenciou uma intensa mionecrose do músculo gastrocnêmio, com presença de fibras edemaciadas, vacuolizadas e perda do material nuclear, características dos venenos botrópicos. A terapia laser e LED reduziram o dano celular causado pelo veneno para todos os tratamentos utilizados. Resultado semelhante foi encontrado por Dourado et al., (2003) que estudou os efeitos da irradiação com laser Ga-As (Arseneto de Galium) em mionecrose no músculo gastrocnêmio, causados por injeção intramuscular do veneno de *Bothrops moojeni*. Esses autores observaram que a terapia laser diminuiu consideravelmente a mionecrose, inibindo a habilidade do veneno para desfazer a integridade da membrana plasmática. Ademais, Doin-Silva et al., (2002), utilizou a terapia a laser para diminuir o processo de mionecrose no músculo tibial induzida pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, e também observou melhora no processo de mionecrose. Existem evidências na literatura mostrando que a foto-irradiação causa vários efeitos biológicos tais como: proliferação celular, síntese de colágeno e aumento de fatores de crescimento (SOMMER et al., 2001), melhorando, dessa maneira, o processo de regeneração. É possível que, a terapia laser de baixa potência reduza a mionecrose por estimular a proliferação celular.

A determinação de uma enzima intracelular como a creatinoquinase (CK), que é liberada após injúria muscular tem sido usada nos estudos de miotoxicidade *in vivo*, a partir da injeção intramuscular do veneno e dosagem no próprio músculo ou no plasma (TEIXEIRA et al., 2003). No presente estudo, a injeção de VBa no músculo gastrocnêmico, causou um aumento na atividade de CK no plasma após 3 h e diminuição da CK muscular residual às 24 h, dessa maneira podemos sugerir que o CK que estávamos dosando estava vindo do músculo lesado, esses resultados estão de acordo com outros da literatura mostrando um efeito mionecrótico induzido após a injeção de *Bothrops asper* (TEIXEIRA et al., 2003; CHAVES

et al., 2005). A terapia de fotobioestimulação com o laser e LED foi eficaz em reduzir a liberação de CK muscular após 24 horas de sua injeção, corroborando os resultados da histologia.

Sugerimos que o tratamento com Laser de baixa potência, LED Infravermelho e LED Vermelho deve ser considerado como uma abordagem terapêutica para o tratamento dos efeitos locais do VBa.

6 Conclusão

- Os tratamentos: Laser, LED Infravermelho e LED Vermelho reduziram significativamente a formação do edema podal, sendo que, o que apresentou um resultado mais expressivo foi o LED Vermelho;
- Em relação à migração para a cavidade peritoneal, o tratamento que mais se mostrou eficaz foi o LED Infravermelho;
- As mudanças significativas nos níveis plasmáticos de CK, em comparação ao grupo controle ocorreram principalmente com LED Infravermelho seguido pelo LED Vermelho e Laser;
- Os tratamentos: Laser, LED Infravermelho e LED Vermelho reduziram significativamente a CK residual nas 24 h nesta ordem;

Referências

- ALBELDA, S.M., et al. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J.**, v. 8, n. 8, p. 504-512, 1994.
- ALBERTINI, R. Avaliação do efeito do laser de baixa potência (As-Ga-Al) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisioterapia Brasil**, v. 3, n. 1, p. 5-15, 2002.
- ALBERTINI, R., et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (TLBP) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageen an-induced rat paw edema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 89, n. 1, p. 50–55, 2007.
- ALBERTINI, R., et al. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy (LLLT). **Photomedicine Laser Surgery**, v. 26, p. 19-23, 2008.
- ALBERTINI, R., et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminium-arsenete (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageen an induced rat paw oedema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 74, n. 2-3, p. 101-107, 2004.
- ALMEIDA-LOPES, L.; 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.
- AMARAL, C. F. S., et al. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.
- ANDRADE, M. F., et al. Avaliação de capacidade de polimerização de um novo dispositivo a base de LED à bateria. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 4, p. 372-376, 2001.
- ANGEL, P., et al. Induction of metallothionein and other mRNA species carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. **Molec. Cell. Biol.**, v. 6, n. 5, p. 1760–1766, 1986.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A 2. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1993-2000, 2003.
- ARROYO, O.; ROJAS, G.; JOSÉ MARIA GUTIÉRREZ. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en: epidemiologia y consideraciones clinicas. **Acta Med. Coastarric.**, v. 41, p. 23-29, 1999.
- AZOFEIFA, K., et al., Ability of fucoidan to prevent muscle necrosis induced by snake venom myotoxins: Comparison of high- and low-molecular weight fractions. **Toxicon**, v. 51, p. 373–380, 2008.
- BARBOSA, A. M., et al. 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., et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515–523, 2003.

BASFORD, J.R. Low level laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 16, p. 331-342, 1995.

BAXTER, G. D. **Therapeutic laser: Theory and practice**. United States of America: Churchill Livingstone, p. 1-19, 1997.

BIONDO, R., et al. 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.

BOLANÕS, R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centro América. **Ed. Universitária de Costa Rica**, San José. 210p. 1984.

BORGES, M. H., et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127, p. 21–31, 2002.

BORTONE, F., et al. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 206-210, 2008.

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

BRUGNERA, A.; PINHEIRO, A. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, p.356, 1998.

BUTTERFIELD; T. A.; BEST, T. M.; MERRICK. M. A. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance between Tissue Damage and Repair **Journal of Athletic Training**, v. 41, n. 4, p. 457–465, 2006.

CALIL-ELIAS, S., et al. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 1 35, p. 1233-1235, 2002.

CAMPANA, V., et al. 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.

CAMPANA, V.; MOYA, M. The relative effects of He Ne laser and meloxican on experimentally induced inflammation. **Laser Therapy**, v. 11, n. 2, p. 36-43, 1999.

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

-
- CARNEIRO, A., et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579, 2004.
- CASALECHI, H. L., et al. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med Sci.**, 16. 2008.
- CAVALCANTE, W.L., et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.
- CHACUR, M., et al. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1173-1181, 2001.
- CHAVES, F., et al. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: comparison between Fab and IgG. **Toxicon**, v. 41, p. 237-244, 2003.
- CHAVES, F., et al. 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- α , IL-1 β 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.
- CLARK, C., et al. Topical 5-aminolaevolinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 19, p. 134-141, 2003.
- DA SILVA, J.O., et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007.
- DAMIANO, E.R., et al. Variation in the velocity, deformation, and adhesion energy density of leukocytes rolling within venules. **Circ. Res.**, v. 79. p. 1122-1130, 1996.
- DOIN-SILVA, R., et al. 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., et al. 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., et al. 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.
- ENWEMEKA, S. C. Therapeutic Light. Rehab Management. Jan/Feb, 2007. Disponível em: [HTTP://www.rehabpub.com/features/1022004/2.asp](http://www.rehabpub.com/features/1022004/2.asp)

FARSKY, S. H. P., et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185–193, 1997.

FARSKY, S. H.P., et al. Complement system activation induced by *Bothrops asper* snake venom (BaV). Contribution for the local inflammatory reaction. In: SIMPOSIO SOC. BRAS. TOX., 6. 2000. São Paulo Anais... do 6th Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia; 2000 93-94; São Pedro, São Paulo: **Soc. Bra. Tox.**, 2000.

FISHER, A.J., et al. Structure of the self-trapped exciton in quartz. **Phys. Rev. Lett.**, v. 64, p. 2667 – 2670, 1990.

FLECKNELL, P. **Animal Anaesthesia**. 2a ed. New York: Academic Press, 2000.

FORTES, Z. B.; NUCCI, G. DE; GARCIA LEME, J.. Effect of endothelin-1 on arterioles and venules *in vivo*. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 13, s. 5, p. 200-201, 1989.

FORTES-DIAS, C.L., et al. Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 323-327, 2002. .

FURTADO et al. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 9, n. 2, p. 219-226, 1991.

GARCIA LEME, J.; FARSKY, S.P. Hormonal control of inflammatory responses **Mediators Inflamm.**, v. 2, n. 3, p. 181–198. 1993. DOI: 10.1155/S0962935193000250.

GENOVESE, W.J. Laser de baixa intensidade. Aplicações terapêuticas em odontologia. **Lovise**, 2000.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. 5, p. 662-675, 1994.

GUTIERREZ, J. M, et al. Comparative study of the oedema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization of polyvalent antivenom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 85, p. 171-175, 1986.

GUTIERREZ, J. M. ARROYO, O; BÁLANOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon**, v. 18, p. 603-610, 1980.

GUTIERREZ, J. M., et al. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine**. v. 3, p. 150-159, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M., et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: CARDOSO, J. L. C., et al. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 310-323.

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., et al. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 23, p. 411-413, 1988.

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

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

HONMURA, A., et al. 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., HOOGENBOOM, H. Antibodies come back from the brain. **Nature Biotechnol.**, v. 16, p. 1015-1016, 1998.

HOURELD, N. N., ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. **Lasers Med Sci.**, v. 23, p.11-18, 2006.

ISSEKUTZ, A.C., et al. Enhanced vascular permeability and haemorrhage-inducing activity of rabbit C5ades arg: probable role of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. **Clin Exp Immunol.**, v. 41, p. 512, 1980.

JANUÁRIO, A. H., et al. 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.

JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A., O'CONNELL, J.L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 93, p. 401-408, 1999.

KANDOLF-SEKULOVIC, L.; KATARANOSVKI, M.; PAVLOVIC, M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. **Photodermatol, Photoimmunol, Photomed.**, v. 19, p. 203-212, 2003.

KARU, T. Cellular mechanisms of low-power laser therapy. *Advanced Energy Medicine*. 2006. Disponível em <http://www.tinnitus.us/tinakarupresentation.html> . Acesso em 22 ago. 2007.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power-laser therapy. **IEEE J. Quantum Electron.**, v. 23, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne Laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **J. Photoclem Photobiol B.**, v. 27, p. 219-223, 1995.

-
- 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.; PYATIBRAT, I.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 219-223, 1995.
- KARU, T.I. Low power laser therapy. In: **Biomedical Photonics Handbook**. Ch. 48, Editor-in-chief Tuan Vo-Dinh, Boca Raton: CRC Press. 2003.
- KITCHEN, S. S., PARTRIDGE, C. H. A review of low level laser therapy parts I: Background, Physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161 – 163, 1991.
- KOLÁROVÁ, H. et al. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v. 24, p. 231-235, 1999.
- LEE, S.Y., et al. Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. **Lasers Surg. Med.**, v. 39, n. 2, p. 180-188, 2007.
- LEON, G., et al. IgG and F (ab) 2 polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema e myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 35, p. 1627-1637, 1997.
- LIZANO, S., et al., Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-77, 2003.
- LOMONTE, B., et al. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom y glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, n. 9, p. 1509–1518, 1994.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipases A₂ myotoxins 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.
- LOW, J., REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2001.
- MAILLET, H.O. **Laser, princípios e técnicas de aplicação**. São Paulo: Manole, 1987.
- MAITLAND, D., et al., Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 39, n. 2, p.164-168, 2007.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the haemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MEBS, D. et al. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 393-404, 1983.

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

MEDEIROS, I. S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Inter-unidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, 2001.

MELO, P. A., et al. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothrops toxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 285-291, 1993.

MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ, G. Interaction of bothrops venoms and antivenin on the release of creatine kinase from skeletal muscle. **Braz J Med Biol Res.**, v. 20, n. 6, p. 821-824, 1987.

MICHELASSI, P. C., et al. Comparative Study Using 685-nm and 830-nm Lasers in Tissue Repair of Tenotomized Tendons in the Mouse. **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, p. 754-758, 2006.

MISERENDINO, L. J., PICK, R. M. **Lasers in Dentistry**. Chicago: Quintessence Publishing, p. 39-54, 1995.

MURAKAMI, S., et al. The effects of aging and oxidative stress on learning behavior in *C. elegans*. **Neurobiol. Aging**, v. 26, n. 6, p. 899-905, 2005.

NUÑEZ, V., et al. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n.7, p. 969-977, 2004.

OLIVO, R. A., et al. Role of cicloxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670-677, 2007.

OSLON, N.C., et al. Dexametasone and Indomethacin modity endotoxin-induced respiratory failure in pies. **J. Appl. Physiol.**, v. 58, p. 274-284, 1985.

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. Hyg.**, v. 58, n. 2, p. 183-189, 1998.

OTERO-PATIÑO, R., et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, p. 1107-1114, 2002.

OWNBY, C. L., et al. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon**, v. 26, p. 459-474, 1988.

-
- PASSARELA, S., et al. Increase of próton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-néon laser. **FEBS Letters**, v. 175, n. 1, p. 95-99, 1984.
- PEARSON, M.K.; LIPOWSKY, H.H. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 279, n. 4, p.1460-1471, 2000.
- PICOLO, G., et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* snake venoms. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 10, p. 1221-1228, 2002.
- PINHEIRO, A. L. B., et al. 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.
- 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.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 703, 2001.
- REBELLO, M. L. **Estudo comparativo de três sistemas de cura da resina composta para colagem de bráquete: resina ativada quimicamente, luz alógena e luz emitida por diodo (LED's), quando submetidas ao teste de resina a tração.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.
- RICCI, R. **Estudo *in vitro* da bioestimulação de células endoteliais em resposta a diferentes dosemetrias do laser de semiconductor fosfeto de índio-gálio-alumínio.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Universidade do Vale do Paraíba, 2003.
- ROGERS, D.F.; JEFFREY, P.K. Inhibition of cigarette smoke-induced airways secretory cell hyperplasia by indomethacin, dexametasone, prednisolone, or hydrocortisone in rat. **Exp. Lung. Res.**, v. 10, n. 3, p. 285-298, 1986.
- ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (eds). *Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates.* **Academic Press, New York, London**, v. 2, p. 346-381, 1971.
- RUCAVADO, A., et al. Thrombocytopenia and plated hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution of metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Throm. Haemostasis**, v. 94, p. 123-131, 2005.
- RYAN, G.B.; MAJNO, G. Acute inflammation. **Am. J. Pathol.**, v. 86, p. 185–274, 1977.
- SABORIO, P.; GONZÁLEZ, M.; CAMBRONERO, M. Snake bite accidents in children in Costa Rica: epidemiology and determination of risk factors in the development of abcess and necrosis. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 359-366, 1998.

-
- SAFAVI, S.M., et al. 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.**, in press, DOI:10.1007/s10103-007-0491-5. 2007.
- SANO-MARTINS, I.S., et al. Platelet aggregation in patients bitten by Brazilian snake *Bothrops jararaca*. **Thrombosis Research**, v.7, n. 32, p. 183-195, 1997.
- SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. **Toxicon**, v. 31, n. 6, p. 733-742, 1993.
- SCHAFFER, M., et al. 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., et al. Systemic Effects of Low-Intensity Laser Irradiation on Skin Microcirculation in Patients with Diabetic Microangiopathy. **Microvascular Research**, v. 64, n. 2, p. 240-246, 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.
- SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 288p, 1992.
- SHIMIZU, N., et al. Inhibition of prosta-glandin E2 and interleukin 1-b production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, v. 74, p. 1382-1388, 1995.
- SOARES, R., et al. Feeding rhythms and diet of *Farfantepenaeus paulensis* under pen culture in Patos Lagoon estuary, Brazil. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 322, p. 167-176, 2005.
- SOLEAR, A. M., et al. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-amilevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylendiaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. **Photochem Photobiol.**, v. 71, p. 724-729, 2000.
- SOMMER, C., et al. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. **J Peripher Nerv. Syst.**, v. 6, p. 67–72, 2001.
- TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M. D.; ZAIDAN, M. L. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 2, 1998.
- TEIXEIRA, C. F. P., et al. Association of Endothelin with Lung Hemorrhage Induced by Immune Complexes in Rats. **Inflammation**, v. 28, n. 5, p. 253-261, 2004.
- TEIXEIRA, C. F.P. et al. 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., et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32, p. 419-426, 1994.

TICLI, F. K., et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra maculoba*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 145–152, 2005.

TICLI, F. K., et al., Rosmarinic acid, a new phospholipase A₂ snake venom inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): anti-inflammatory and antimyotoxic properties. **Toxicon**, v.46, p. 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.

TUNER, J., HODE, L. **Low level laser therapy: Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 2002.

VAN ARMAN, C.G., et al. H.H. Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 150, p. 328-334, 1965.

VANE, J. Control of the circulation by endothelial mediators. Inaugural G.B. West Memorial Lecture. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 101, p. 333–345, 1993.

VEÇOSO, M. C. **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.

VILLALOBOS, J. C., et al. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 8, p. 1382–1389, 2007.

VINCK, E. M., et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Laser Med. Sci.**, v. 18, p. 95-99, 2003.

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.

WEISS, E., et al. The broad spectrum revisited: Evidence from plant remains. **PNAS**, v. 101 n. 26, p. 9551-9555, 2004.

WHELAN, S., et al. Dopant redistribution and electrical activation in silicon following ultra-low energy boron implantation and excimer laser annealing. **Phys. Rev.**, v. 67, n. 7, 8 pages, 2003.

WHELAN, S., et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. **J. Clin. Laser.Med. Surg.**, v. 20, p. 319–324, 2002.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of clinical laser Medicine and Surgery**, v. 16, n. 03, p. 159-165, 1998.

ZAMUNER, S. R., et al. *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., et al. 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.

ZAMUNER, S. R., et al. Cyclooxygenase 2 mediates post-inflammatory colonic secretory and barrier dysfunction. **Gut - An International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Inglaterra, v. 52, n. 12, p. 1714-1720, 2003.

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., et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.

ZANIN, I. C. J.; GONÇALVES, R. B.; BRUGNERA, A. JR.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: in vitro study. **J Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n. 2, p. 324-330, 2005.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º **A118/CEP/2007**, sobre “*Efeito do laser de baixa potência na reação inflamatória induzida pelo veneno de Bothrops asper*” sob a responsabilidade de Profa. Dra. **Stella Regina Zamuner** foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

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, 18 de dezembro de 2007.



PROF. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade do Vale do Paraíba – Univap