



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA

Flávia Regina Ferreira Soares Pisete

**EFEITO SISTÊMICO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO EM
LESÃO CAUSADA PELO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*
SOBRE BIOMARCADORES DA HEMORRAGIA E MIONECROSE**

São Paulo

2019

Flávia Regina Ferreira Soares Pisete

**EFEITO SISTÊMICO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO EM
LESÃO CAUSADA PELO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*
SOBRE BIOMARCADORES DA HEMORRAGIA E MIONECROSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

São Paulo

2019

Pisete, Flávia Regina Ferreira Soares.

Efeito sistêmico da terapia de fotobiomodulação em lesão causada pelo veneno de bothrops jararacussu sobre biomarcadores da hemorragia e mionecrose. / Flávia Regina Ferreira Soares Pisete.

2019.

67 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Stella Regina Zamuner.

1. Biomarcadores. 2. Mionecrose. 3. Hemostasia. 4. LED.
5. Bothrotopis jararacussu.

I. Zamuner, Stella Regina.

II. Título



São Paulo 19 de dezembro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **FLAVIA REGINA FERREIRA SOARES PISETE**

Titulo da dissertação: **EFEITO SISTÊMICO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO EM LESÃO CAUSADA PELO VENENO DA BOTHROPS JARARACUSSU SOBRE BIOMARCADORES DE HEMORRAGIA E MIONECROSE.**

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Membro: PROF. DR. CARLOS ALBERTO SILVA

Membro: PROFA. DRA. MARÍLIA DE ALMEIDA CORREIA

Dedico essa conquista primeiramente à Deus que guiou e iluminou os meus passos até aqui. Ao meu querido e amado esposo que sempre se mantém em pé quando a minha alma fraqueja e aos meus filhos que são a razão da minha existência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à minha família por estarem sempre ao meu lado. Agradeço à Dra. Stella por ser sempre tão acessível, compreensiva e receptiva principalmente nos momentos de ansiedade relacionados à condução deste trabalho. Por me ensinar com paciência e orientar com sabedoria e critério.

Agradeço às colegas Cristiane, Amanda e alunas da Iniciação Científica por me ajudarem com os experimentos e dividirem comigo os anseios e alegrias. Aos colegas de turma pela companhia e companheirismo diário. Ao Hospital de Força Aérea de São Paulo e à Força Aérea Brasileira por incentivarem o meu crescimento e aprimoramento profissional.

"O real não está no início nem no fim, ele se mostra pra gente é no meio da travessia..."

Guimarães Rosa

RESUMO

São recorrentes no mundo, os acidentes ofídicos relacionados às serpentes do gênero *Bothrops*. As serpentes desse gênero produzem veneno que apresentam no indivíduo acometido, efeitos locais e sistêmicos graves e complexos. A soroterapia, que é o tratamento de primeira escolha, apesar de neutralizar alguns efeitos sistêmicos, é ineficaz em neutralizar os efeitos locais causados pelo veneno. Assim, evidencia-se a importância da procura de terapias coadjuvantes à soroterapia, na evolução do quadro local da vítima desse tipo de acidente. Diversos estudos demonstraram a efetividade do uso da fotobiomodulação no tratamento das lesões causadas pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Diante disso, o objetivo desse estudo é o de ampliar o conhecimento das ações da fotobiomodulação utilizando o LED (*Light Emitting Diode*) sobre os biomarcadores da mionecrose e dos distúrbios da hemostasia, causados pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Para isso, quatro grupos experimentais de ratos do gênero Wistar foram utilizados (n=20/grupo) e divididos em dois grupos controle, injetados com salina e tratados com LED ou não, e dois grupos injetados com o veneno da *Bothrops jararacussu* (80 µg/músculo), no músculo gastrocnêmio e tratados no local da inoculação ou não. O LED foi utilizado no comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia 5,8 J/cm² e potência de 160 mW. Os animais foram sacrificados para a coleta do sangue, por punção da veia cava, nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas (n=5/tempo; n=20/grupo) após a inoculação da salina ou veneno. Experimentos com dose de 300 µg de veneno foram realizados para coletas nos tempos 1 e 6h (n=5/tempo; n=10/grupo). Foram realizadas dosagens de Plaquetas, Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial e Fibrinogênio, TGO, LDH, CPK, FAL para avaliar qual o efeito da terapia com o LED nesses biomarcadores. Os resultados mostraram que o LED apresentou efeito protetor apenas para os biomarcadores TGO e CPK.

Palavras-chave: biomarcadores, mionecrose, hemostasia, LED, *Bothrops Jararacussu*

ABSTRACT

Accidents with *Bothrops* genus snakes are recurrent in the world. Those snakes are capable to produce venom that causes severe and complex systemic and local effects in the victim. Serotherapy, the first-choice treatment, despite neutralizing some systemic effects, is ineffective in neutralizing the local response caused by the venom. Then, it is essential to look after alternative therapies for serotherapy, that helps in the local damages of the venom. Several studies have demonstrated the effectiveness of the photobiomodulation in the treatment of lesions caused by venom of snakes of the genus *Bothrops*. Therefore, the objective of this study is to increase the knowledge photobiomodulation actions using LED (Light Emitting Diode) on the biomarkers of myonecrosis and hemostasis disorders caused by venom of the snake *Bothrops jararacussu*. In this context, four experimental groups of rats genus Wistar were used (n = 20 / group) and divided into control groups and the group that were injected with the venom of *Bothrops jararacussu* (30 μ L / mL) in the gastrocnemius muscle and treated at local with LED wavelength 660 nm, energy density 5.8 J / cm² and potency of 160 mW. The animals were sacrificed for blood collection by vena cava puncture at times of 1, 3, 6 and 24 hours (n = 5 / time; n = 20 / group) after inoculation of the venom. Experiments with the dose 300 μ g of venom were performed for collection at times 1 and 6h (n=5/time; n=10/group). Measurements of platelets, prothrombin time, partial thromboplastin time and fibrinogen, TGO, LDH, CPK, FAL were be performed to assess the effect of LED on those biomarkers. The results showed that LED had a protective effect only for TGO and CPK.

Key words: biomarkers, myonecrosis, hemostasis, LED, *Bothrotops Jararacussu*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Número aproximado de espécies de serpentes importantes no contexto médico em todo o mundo; segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2017.

Figura 2: Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. (FERREIRA, C.N et.al., 2010).

Figura 3: Protocolo Experimental, dos grupos não tratados com o LED para dose de 80µg, em Linha do Tempo.

Figura 4: Protocolo Experimental, dos grupos tratados com o LED para a dose de 80µg, em linha do tempo.

Figura 5: Protocolo Experimental, dos grupos não tratados com o LED para a dose de 300µg, em Linha do Tempo.

Figura 6: Protocolo Experimental, dos grupos tratados com o LED para dose de 300µg, em linha do tempo.

Figura 7: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as Plaquetas.

Figura 8: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina.

Figura 9: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial.

Figura 10: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as Fibrinogênio

Figura 11: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a TGO

Figura 12: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a LDH

Figura 13: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a CPK

Figura 14: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a FAL

Figura 15: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as Plaquetas - 300µg

Figura 16: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina - 300µg

Figura 17: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada - 300µg

Figura 18: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Fibrinogênio - 300µg

Figura 19: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a TGO - 300µg

Figura 20: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a LDH - 300µg

Figura 21: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a CPK - 300µg

Figura 22: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a FAL - 300µg

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos esperados do veneno botrópico nos biomarcadores da Hemostasia e da Mionecrose

Tabela 2: Parâmetros dosimétricos do LED

Tabela 3: Resumo dos efeitos obtidos com a inoculação do veneno e com o tratamento com o LED, para as doses de 80µg e 300µg

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST – Aspartato Aminotransferase

CPK - Creatinofosfoquinase

FAL – Fosfatase Alcalina

FT – Fator Tecidual

LDH- Lactato Desidrogenase

LED - Light Emitting Diodes

µg – micrograma

RPM - Rotações Por Minuto

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TGO – Transaminase Oxalacética

TP – Tempo de Protrombina

TTPa – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

VBj – Veneno *Bothrops jararacussu*

1. Introdução	13
1.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	15
1.2 Efeitos Hemostáticos	16
1.3 Efeitos Miotóxicos	17
1.4 Soroterapia.....	18
1.5 Terapia com o <i>Light Emitting diode</i> (LED)	18
1.6 Uso do LED em acidentes ofídicos.....	19
1.7 Biomarcadores.....	20
1.8 Efeitos esperados do veneno nos biomarcadores.....	24
1.9 Objetivos.....	25
2 Material e Métodos.....	27
2.1 O veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	27
2.2 Os animais	27
2.3 Protocolo Experimental.....	27
2.4 Irradiação <i>Light Emitting diode</i> (LED).....	30
2.5 Dosagens Bioquímicas.....	31
2.6 Análises Hematológicas.....	31
2.7 Análise estatística	32
3 Resultados	33
3.1 Experimentos com a dose de 80 µg.....	33
3.2 Experimentos com a dose de 300 µg.....	41
3.3 Resumo dos Resultados Obtidos.....	49
4 Discussão.....	55
5 Conclusão	61
6 Referências bibliográficas	62
Anexo I	66
Anexo II	67

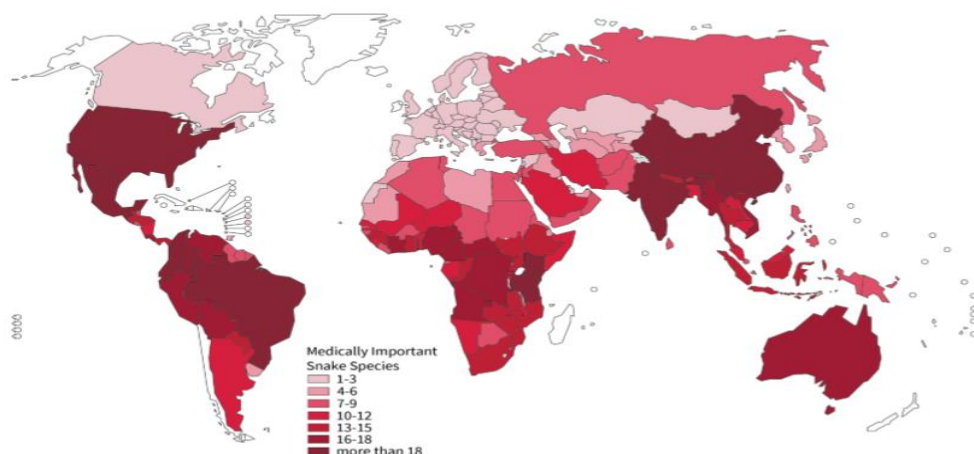
1 INTRODUÇÃO

São recorrentes no mundo os acidentes ofídicos relacionados às serpentes venenosas. A Organização Mundial da Saúde incluiu, em junho de 2017, os acidentes ofídicos por serpentes peçonhentas à lista de prioridade das doenças tropicais negligenciadas. Estima-se que 5 milhões de acidentes ocorram por ano sendo que desses, 2,7 milhões envolvem serpentes venenosas o que causa de 81.000 a 138.000 mortes por ano, em média 400.000 amputações, entre outras morbidades permanentes.¹

Apesar de existirem mais de 3000 espécies de serpentes em todo o mundo, são consideradas de importância médica pela OMS, apenas 250 espécies, distribuídas por 160 países, sendo mais prevalentes em países de regiões subtropicais e tropicais, incluindo América Latina, África, Ásia e Oceania (figura 1).¹ A distribuição dos envenenamentos e mortalidade é variável sendo numericamente menor na Europa e Austrália e bem maior em regiões mais populosas como África subsaariana, sul e sudeste da Ásia.²

Constituem grupos de risco as populações pobres da zona rural, agricultores, crianças de 10 a 14 anos, pessoas que vivem em áreas com infraestrutura escassa, pessoas sem acesso à educação e condições de saúde básicas, crianças menores de 5 anos e gestantes.²

Figura 1 - Número aproximado de espécies de serpentes importantes no contexto médico em todo o mundo; segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2017.



Fonte: OMS 2018

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, apenas na Índia, foi estimado que, em média, 2,8 milhões de pessoas se acidentam e 46.900 morrem por picada de serpentes a cada ano. Em Bangladesh estima-se que 589.919 acidentes ocorrem a cada ano resultando em média em 6.041 mortes e, na África subsaariana, onde os casos são provavelmente, subnotificados, estima-se que 7.000 a 20.000 mortes ocorrem por ano.²

No Brasil, o Ministério da Saúde possui uma lista de doenças de notificação compulsória dos acidentes com animais peçonhentos, como cobras, escorpiões e aranhas. A Portaria número 204, de 17 de fevereiro de 2016, define que acidentes por animais peçonhentos são agravos de notificação compulsória imediata. Isso significa que o profissional de saúde que atender paciente acometido por qualquer acidente envolvendo animais peçonhentos, como serpentes venenosas, deve comunicar a Secretaria Municipal de Saúde, em até 24 horas após a ocorrência desse agravo, seja no sistema público ou privado de saúde, por meio do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Devem ser notificados todos os casos confirmados de pacientes com evidências clínicas específicas de envenenamento por animal peçonhento, independente da identificação do animal causador.²⁷

Dados disponibilizados pelo portal do Ministério da Saúde revelam que em 2017 a incidência de acidentes ofídicos no Brasil foi de 14,6/100.000 habitantes, sendo o maior número encontrado desde 2013. Dados coletados pelo SINAN mostram que de 2017 até março de 2018, 111 óbitos ocorreram em decorrência de picadas de serpentes peçonhentas no Brasil. ^(3,4) Dentre os sobreviventes de acidentes ofídicos, muitos convivem com danos físicos permanentes relacionados à necrose tecidual local, danos ao sistema nervoso bem como consequências psicológicas que impactam diretamente na capacidade econômica do indivíduo acometido, o que onera o sistema público de saúde e os cofres públicos.²

As serpentes do gênero *Bothrops*, da família *Viperidae*, são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes no Brasil.⁵ Compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais frequentes são *B. atrox*, comuns no norte do

Brasil; *B. erythromelas*, presentes na região nordeste; *B. neuwiedi*, que pode ser encontrada em todo território nacional, exceto na região norte do país; *B. jararaca*, comum na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, distribuída no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste e *B. alternatus*, comum na região sul do país.⁶

As serpentes desse gênero possuem a cauda lisa, não possuem chocalho e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem. São popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca do rabo branco, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia e caiçaca. O habitat natural está relacionado a ambientes úmidos, como em matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Dessa forma, aparecem com maior frequência em zonas rurais e periferias de grandes cidades, predominantemente, no período noturno ou crepuscular, devido aos hábitos característicos das espécies.⁶

O veneno das serpentes desse gênero apresenta efeitos locais e sistêmicos. Dentre as atividades fisiopatológicas do veneno está a ação proteolítica que leva à lesão, destruição tecidual e necrose no local da inoculação do veneno. Observa-se também ação coagulante decorrente da ativação da cascata da coagulação e a ação hemorrágica em virtude da lesão na membrana basal dos capilares sanguíneos podendo causar sangramentos sistêmicos, além da ação hipotensora séria. A lesão local causada pelo veneno é acompanhada de dor e edema. Podem surgir equimoses, lesões bolhosas e sangramentos no local da picada e em casos mais graves, necrose com necessidade de amputação do membro acometido. Dentre as manifestações sistêmicas estão náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão, hemorragias à distância e choque.⁶

1.1 *Bothrops jararacussu*

A espécie *Bothrops jararacussu* é, comumente, encontrada em florestas tropicais, em regiões de pântanos e às margens dos rios de alguns países da América do Sul, tais como o Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina.⁷ O potencial letal do veneno da *B. jararacussu* é muito maior que os das outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, e é composto, primariamente, por proteínas, como fosfolipase A2, serina

proteínases, metaloproteases e lecitinas não enzimáticas.⁸ Os Efeitos hemostáticos e miotóxicos são manifestações importantes do veneno dessa espécie e o uso do antiveneno, terapia de escolha para o tratamento, não reverte os efeitos locais como as lesões necróticas, o edema, e a hemorragia local que pode afetar, até mesmo permanentemente, a função do membro afetado.⁹

1.2 Efeitos Hemostáticos

O sistema hemostático é composto pelo endotélio, plaquetas, fatores pró e anticoagulantes e fatores pró e antifibrinolíticos. É responsável por manter o sangue fluido dentro dos vasos sanguíneos e por possibilitar que, ao serem expostos à lesões ou estímulos, seja desencadeada resposta no sentido de conter o dano causado. A formação do coágulo sanguíneo consiste na resposta principal ao endotélio lesado e para que haja equilíbrio, necessita-se de níveis adequados de fatores pró coagulantes e anticoagulantes, número e função plaquetária normais, endotélio íntegro e sistema fibrinolítico funcionando corretamente.²⁵

O veneno das serpentes da família Viperidae apresentam diversas proteínas e peptídeos com atividade pró ou anticoagulante, pró ou anti agregação plaquetária e podem apresentar também atividade fibrinolítica. Geralmente, acidentes com serpentes dessa família, causam sangramentos persistentes pelo consumo aumentado do fibrinogênio e consumo dos fatores da coagulação.¹⁰

A trombocitopenia e outras alterações nos parâmetros da coagulação, tais como diminuição plasmática do fibrinogênio devido ao aumento do consumo e fibrinólise, são os achados laboratoriais mais comuns nas vítimas de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. As Metaloproteínases pertencem a uma família de enzimas zinco-dependentes que contribuem para as atividades inflamatórias, proteolíticas, hemorrágicas e pró-coagulantes do veneno. Estas são classificadas em P-I, P-II e P-III, sendo a ação de cada uma diferente da outra. Essas enzimas tendem a aumentar o consumo do fibrinogênio. Já as serina proteínases, enzimas que apresentam um resíduo serina reativo, afetam a agregação plaquetária, a coagulação sanguínea e a fibrinólise, além de demonstrarem efeitos anti-hemostáticos.¹¹

Há também, por outro lado, mecanismos que ativam a coagulação sanguínea, principalmente daqueles pacientes severamente envenenados, o que explica a

ocorrência de alguns casos de Síndrome da Coagulação Intravascular Disseminada. Além dos próprios componentes do veneno, ao se analisar os mecanismos fisiológicos da coagulação, verifica-se que há efeitos indiretos na hemostasia causadas por mediadores gerados ou liberados no local da inoculação do veneno. A estimulação de células endoteliais, monócitos e plaquetas por mediadores inflamatórios induzem a expressão e a atividade do Fator Tecidual (TF). Dessa forma, a ação do veneno nessas células leva ao aumento da atividade do fator tecidual que, ativa a via extrínseca da coagulação.¹¹

Os exames laboratoriais como dosagem de plaquetas, Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial e a dosagem de fibrinogênio, podem servir como apoio diagnóstico na determinação do prognóstico do paciente envenenado. A presença da plaquetopenia e outras alterações do hemograma permitem acompanhar a progressão das complicações locais e sistêmicas.

1.3 Efeitos Miotóxicos

Os efeitos miotóxicos relacionam-se à lesão ao tecido muscular causada pela toxicidade dos componentes do veneno. Os efeitos locais do veneno dependem do tamanho da serpente, da quantidade de veneno inoculado, das condições físicas da vítima, do tempo e da qualidade dos primeiros socorros prestados. A inoculação do veneno causa lesão nos tecidos da pele e dos músculos esqueléticos que não é revertida com a utilização do soro antiofídico.¹² Tais lesões associadas a outros efeitos locais do veneno como edema, hemorragia, acidose local, abscessos bolhosos e equimose, podem levar a imobilização por longos períodos de tempo do membro afetado predispondo ao aparecimento de infecções, problemas associados à perfusão muscular e outras sequelas que dificultam a recuperação do indivíduo.¹³

Diversas miotoxinas tem sido isolada do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A inoculação do veneno leva a uma série de eventos degenerativos drásticos, provavelmente iniciados ao nível da membrana plasmática das células que culmina na necrose dos músculos esqueléticos. Reação inflamatória intensa ocorre e há aumento de mediadores inflamatórios como a IL-1 β , IL-6, TNF- α e interferon γ .¹⁴ As miotoxinas demonstram ter características de enzimas fosfolipase A2 que induzem

mionecrose em camundongos e apresentam a capacidade de hidrolisar fosfolipídios da membrana plasmática da célula muscular.¹⁵

Além da ação das miotoxinas por si só, atribui-se também à ocorrência da miotoxicidade, o comprometimento da microcirculação que causa isquemia dos vasos e artérias intramusculares impedindo que a oxigenação do local seja efetiva¹⁵. Os vasos sanguíneos podem sofrer trombose e a ação do veneno causa fibrose do músculo o que dificulta a regeneração da fibra muscular.¹⁶

1.4 Soroterapia

O tratamento para os acidentes ofídicos causados por serpentes peçonhentas consiste na administração endovenosa do soro antiofídico. O soro é produzido por meio da imunização de cavalos inoculados com a mistura de venenos de cinco serpentes do gênero *Bothrops*. A efetividade do tratamento com o antiveneno depende do tempo decorrido entre o acidente e a administração do soro e também da quantidade de veneno inoculado. Portanto, o tratamento com o soro antiofídico não é 100% eficaz principalmente no que tange às manifestações locais do veneno. A investigação por terapias alternativas se faz necessária para auxiliar no tratamento principalmente dessas manifestações locais.¹⁶

A fotobioestimulação tem sido estudada e tem demonstrado efeitos positivos em modelos experimentais que utilizam venenos de serpentes peçonhentas.¹¹ Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado benefícios no uso do laser de baixa potência bem como do LED na diminuição da mionecrose, da inflamação e da hemorragia após a inoculação e ação local do veneno.

1.5 Terapia com o LED

A fotobiomodulação tem sido utilizada como ferramenta terapêutica a qual, por meio dos comprimentos de onda entre 400 a 1000 nm, estimula a função fisiológica a nível celular. Consiste na utilização de lasers, dos diodos emissores de luz (Light Emitting Diodes-LED) ou ambos, em diferentes comprimentos de onda.¹⁷ O LED é um diodo semi-condutor que emite luz através da conversão da energia elétrica, em comprimentos de onda que variam de 400 nm (azul) a 1200 nm (Infravermelho). As

cores mais usadas são azul (400 a 470 nm), verde (470 a 550nm), vermelho (630 a 700 nm) e infravermelho (700 a 1200nm).¹⁸

A irradiação por laser ou LED tem sido largamente utilizada por fisioterapeutas, dentistas, dermatologistas, reumatologistas e veterinários no tratamento da dor, edema, eczema, dermatites, e doenças crônicas como artrites e artroses. Acredita-se que os fótons de luz são absorvidos por cromóforos como a citocromo C oxidase na mitocôndria da célula. Alterações na atividade dessa enzima aumentam a produção de ATP intracelular. Com o aumento do potencial energético a tendência é a normalização da função celular. ^(18,19)

Estudos apontam que a terapia com LED reduz o tamanho de lesões hemorrágicas, o edema¹⁹, acelera a cicatrização de feridas, aumenta o crescimento celular de osteoblastos, células musculares esqueléticas, células epiteliais humanas e fibroblastos, além de diminuir a dor.¹⁸ Além desses efeitos, a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local também são observados.^(18,20)

1.6 Uso do LED em acidentes Ofídicos

Diversos estudos demonstram a efetividade do uso da fotobiomodulação no tratamento das lesões causadas pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.^(9,12,13,17,19,20) Um estudo realizado com camundongos, demonstrou que o tratamento com LED infravermelho diminuiu em 84% o edema e em 35% a lesão hemorrágica causada pela inoculação do veneno de *Bothrops moojeni*.¹⁹ Outro estudo, também realizado em camundongos avaliou a ação de dois tipos Laser nos danos locais aos tecidos, causados pelo veneno da mesma espécie *B. moojeni*. Avaliaram-se biomarcadores de mionecrose e cortes histológicos do local e concluiu-se que os biomarcadores diminuíram e houve redução do infiltrado inflamatório dos tecidos após a aplicação do laser.¹²

O uso da fotobiomodulação no tratamento das lesões causadas pelo veneno de serpentes peçonhentas tem sido, cada vez mais, estudado e tem se mostrado uma ferramenta promissora na diminuição dos efeitos miotóxicos e hemorrágicos causados pelo envenenamento. Promissora uma vez que a terapia com o antiveneno pode não ser 100% eficaz, seja por demora no primeiro atendimento ao paciente, seja pela

gravidade do acidente. Além disso é uma alternativa de baixo custo, segura já que não apresenta efeito térmico, e sem efeitos adversos demonstrados.

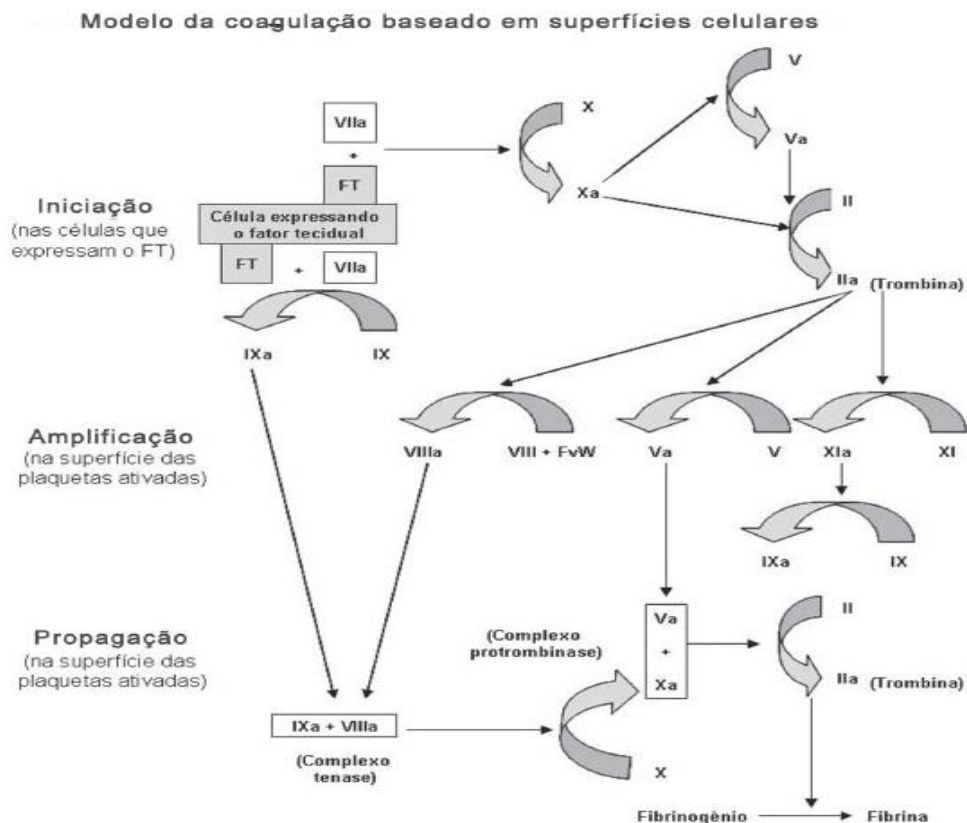
1.7 Biomarcadores

1.7.1 Plaquetas

A participação das plaquetas na hemostasia é fundamental no aspecto fisiológico. Sua ação está envolvida na adesão do endotélio lesado, agregação plaquetária com a formação de superfície de fosfolípidos onde ocorrem as reações da coagulação e liberação de substâncias pró-coagulantes. ⁽²⁵⁾

A contagem de plaquetas é parte integrante do exame de hemograma e é normalmente realizada por em equipamentos automatizados por um canal de contagem que diferencia os elementos sanguíneos pelo volume. A participação das plaquetas no processo de coagulação sanguínea fica bem representado no esquema da cascata da coagulação, apesar da divisão da cascata da coagulação em via intrínseca e extrínseca não ocorrer in vivo (Figura 2). ⁽²¹⁾

Figura 2 – Ilustração do Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares em suas fases de Iniciação, Amplificação, Propagação. Fator Tecidual (FT), ativado (a).



Fonte: FERREIRA, C.N et.al., 2010

1.7.2 Tempo de Protrombina (TP)

O Tempo de Protrombina foi descrito por Quick, em 1935, para quantificar a protrombina e avaliar os fatores II, V, VII e X, fatores da via extrínseca da coagulação. O RNI (Relação normalizada Internacional) foi instituído pela OMS com o objetivo de uniformizar os resultados levando-se em consideração o reagente, a tromboplastina, utilizado.²⁴ O TP é um indicador de doença hepática moderada a severa e de doenças hepáticas crônicas além de avaliar a integridade da via extrínseca e da via comum da coagulação.²⁵

O teste em si, mede o tempo de formação do coágulo em plasma citratado após a adição da tromboplastina (fator tecidual) e da adição de cloreto de cálcio. O alargamento no TP significa diminuição ou disfunção de um ou mais fatores da via extrínseca ou comum da coagulação ou presença de algum inibidor que pode interferir na reação como é o caso do anticoagulante lúpico.²⁵

1.7.3 Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa)

O TTPa avalia a integridade da via intrínseca e da via comum da coagulação que envolve a participação dos fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, II. Para realização do exame utiliza-se a trombina que é composta basicamente de fosfolipídeos. O alargamento do TTPa reflete a diminuição ou disfunção de um ou mais fatores da coagulação associados, ou, assim como no TP, a presença de um inibidor como o anticoagulante lúpico.²⁵

1.7.4 Fibrinogênio

O fibrinogênio é o principal fator da coagulação plasmática sintetizado no hepatócito. Trata-se de uma molécula heterodimérica que possui em cada metade três cadeias de polipeptídeos diferentes ligadas por pontes de sulfeto.²² O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda e existem níveis elevados transitórios em pacientes que sofrem de stress, inflamação, traumatismos, neoplasias, infecções e gravidez. Níveis persistentemente elevados são considerados fator de risco elevado para doenças cardiovasculares. Níveis reduzidos de fibrinogênio podem induzir episódios de hemorragia e estão associados à Coagulação Intravascular Disseminada.²²

A trombina cliva as cadeias A α e B β do fibrinogênio para liberar fibrinopeptídeos A e B, respectivamente, do final da cadeia aminoterminal. Após a liberação do fibrinopeptídeo, os monômeros de fibrina resultantes sofrem polimerização para formar um coágulo insolúvel de fibrina.²²

1.7.5 Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO)

Trata-se de uma transaminase que transfere um grupo alfa-amino de um aminoácido para alfa-cetoácido. A elevação sérica dessa e de outras aminotransferases indicam presença de necrose tecidual. Nos hepatócitos cerca de 70% de TGO são originados no citoplasma e 30% nas mitocôndrias. Apresenta meia-vida de 17 horas e está presente no músculo cardíaco, esquelético, fígado, rins, pâncreas e hemácias.

1.7.6 Lactato Desidrogenase (LDH)

Trata-se de uma enzima que apresenta 5 isoformas. Praticamente todos os órgãos do corpo humano apresentam essa enzima com diferentes proporções das isoformas existentes. As principais causas de aumento da LDH estão relacionadas à hemólise, exercício físico intenso previamente à coleta, linfomas, leucemias, hipóxia, doenças respiratórias, infarto agudo do miocárdio, anemia hemolítica, etilismo entre outras condições. No músculo esquelético 60% da LDH presente é a isoforma LD5 seguido de 30% da LD4 e 10% da LD3.²⁵

1.7.7 Creatinofosfoquinase (CPK)

A creatina kinase (CK) ou (CPK), de um modo geral, catalisa a fosforilação reversível da creatina por ATP. São três isoenzimas compostas por subunidades M, B ou ambas. As medidas de CK são utilizadas no diagnóstico e tratamento do infarto agudo do miocárdio e também, é um indicador sensível de lesões musculares. A CK aumenta sempre que se verifica necrose ou regeneração muscular e está elevada na maioria das miopatias e nas condições relacionadas a necrose muscular como a rabdomiólise.

1.7.8 Fosfatase Alcalina (FAL)

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em quase todos os tecidos humanos, principalmente na membrana das células. Pode ser encontrada em tecido ósseo, endotélio vascular, túbulos renais, enterócitos, epitélio biliar, cérebro, folículos capilares. Apresenta-se em níveis elevados no epitélio intersticial, túbulos renais, ossos, fígado e placenta. Existem 4 isoenzimas e as funções fisiológicas de cada isoforma não estão bem definidas em todos os tecidos. A isoforma que apresenta função mais bem definida é a TNSALP que tem papel importante na mineralização óssea e é um marcador precoce da síntese de colágeno.²³ Além disso, a enzima está associada ao transporte de lípidos à nível intestinal. O aumento de fosfatase alcalina estão relacionados à causas fisiológicas, doenças do fígado ou dos ossos.

1.8 Efeitos esperados do veneno nos biomarcadores

Os efeitos esperados do veneno botrópico nos biomarcadores contextualizados foram resumidos na Tabela 1 para melhor entendimento:

Tabela 1: Efeitos esperados do veneno botrópico nos biomarcadores da Hemostasia e da Mionecrose

Biomarcador	Risco	Efeito esperado do Veneno
Plaquetas	Diminuição: Hemorragia	↓
Tempo de Protrombina	Aumento: Hemorragia	↑
Tempo de Tromboplastina Parcial	Aumento: Hemorragia	↑
Fibrinogênio	Diminuição: Hemorragia	↓
TGO	Aumento: Lesão celular	↑
LDH	Aumento: Lesão celular	↑
CPK	Aumento: Lesão celular	↑
FAL	Aumento: Lesão celular	↑

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Geral

Ampliar o conhecimento das ações do LED (*Light Emitting diodes*) sobre os biomarcadores da mionecrose e dos distúrbios da hemostasia, causados pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.

1.9.2 Específico

Através de experimentos com ratos, do gênero Wistar, foram avaliados os efeitos da irradiação do LED sobre a lesão local induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu* quanto aos biomarcadores dos distúrbios da hemostasia ao dosar:

Plaquetas,

Tempo de Protrombina (TP),

Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa) ,

Fibrinogênio,

e biomarcadores da mionecrose ao dosar:

Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO),

Lactato Desidrogenase (LDH),

Creatinofosfoquinase (CPK) e

Fosfatase Alcalina (FAL).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Biologia Celular do curso de Mestrado e Doutorado em Medicina, no Biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Força Aérea de São Paulo.

2.1 Veneno de serpente *B. jararacussu* (VBj)

Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes, provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba, fornecidos pelo prof. Dr. José Carlos Cogo. Os venenos foram reunidos em um mesmo tubo, homogeneizados, submetidos a liofilização e mantidos a -20°C até o momento de sua utilização. O veneno liofilizado foi diluído em salina estéril no momento da inoculação no animal.

2.2 Os animais

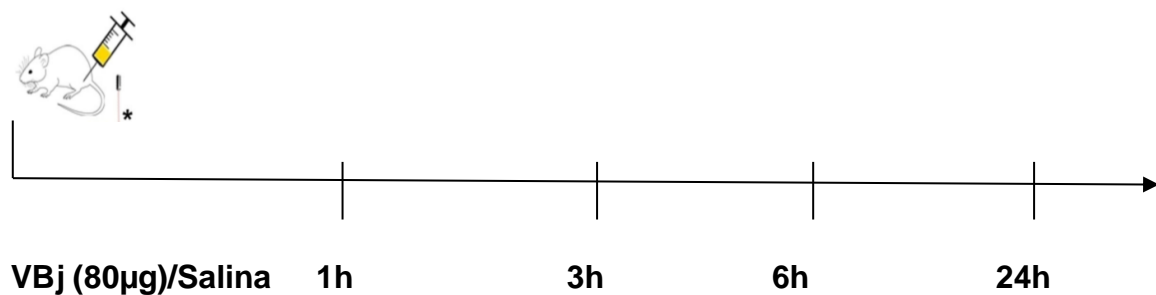
Foram utilizados ratos do gênero wistar, fêmeas, adultos, com peso de aproximadamente 200 a 250 gramas e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UNINOVE sob o CEUA 3593120618. Os animais foram mantidos na temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h/12h, com alimentação e água ad libitum. Os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com xylazina (10mg/mL) e Cloridrato de Cetamina (100mg/mL), dose de 10mg/Kg e 90mg/Kg respectivamente, 5 minutos antes da coleta do sangue e eutanásia. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o estabelecido pelo comitê de Ética da Universidade Nove de Julho.

2.3 Protocolo Experimental

Quatro grupos experimentais de ratos do gênero wistar foram utilizados, sendo que cada grupo foi composto de 20 animais ($n=20/\text{grupo}$). O grupo nº 1 é o grupo controle e foi inoculado com solução salina e não foi irradiado com o LED. O grupo 2, foi inoculado com solução salina e foi irradiado com o LED. O grupo 3 foi inoculado com veneno de *B. jararacussu* (VBj) e não foi tratado com o LED e por fim, o grupo 4 foi inoculado com o veneno e tratado com o LED. A dose do veneno utilizada foi de

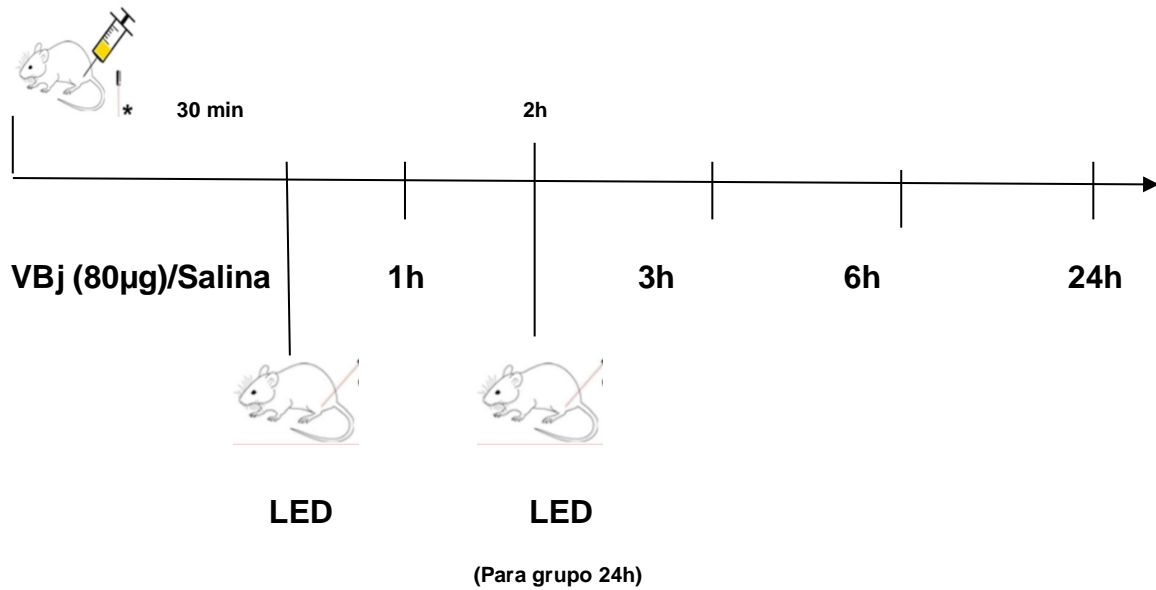
80 μg e o veneno foi diluído com solução salina estéril no momento da inoculação. O local da aplicação do veneno, da solução salina e do LED foi o músculo gastrocnêmio e o tempo estipulado, após a inoculação do veneno ou salina, para a eutanásia dos animais e coleta do sangue, foi o mesmo para todos os grupos: 1, 3, 6 e 24 horas ($n=5/\text{tempo}$; $n=20/\text{grupo}$) (Fig. 3 e Fig. 4). Foram realizados os mesmos experimentos utilizando-se a dose de 300 μg e os tempos estipulados, após a inoculação do veneno ou salina, para a eutanásia dos animais e coleta do sangue de 1, 6 horas ($n=5/\text{tempo}$; $n=20/\text{grupo}$) com intuito de comparar os resultados obtidos (Fig. 5 e Fig. 6).

Figura 3 - Protocolo Experimental, dos grupos não tratados com o LED, em linha do tempo



Fonte: Produzido pela própria autora.

Figura 4 - Protocolo Experimental, dos grupos tratados com o LED em linha do tempo.



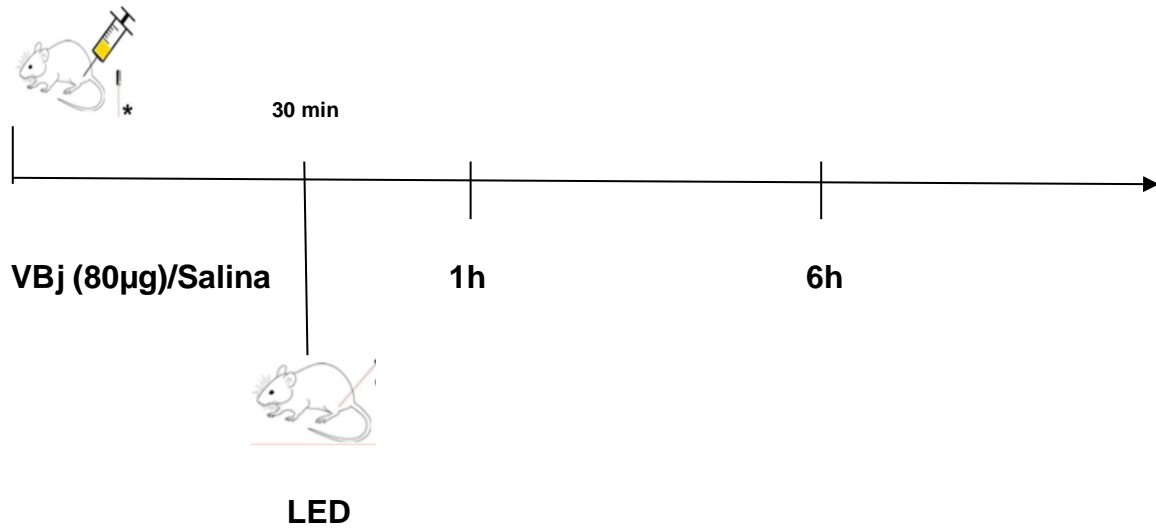
.Fonte: Produzido pela própria autora.

Figura 5 - Protocolo Experimental, dos grupos não tratados com o LED para dose de 300 μ g, em linha do tempo



.Fonte: Produzido pela própria autora.

Figura 6: Protocolo Experimental, dos grupos tratados com o LED para dose de 300 μ g, em linha do tempo.



.Fonte: Produzido pela própria autora.

2.4 Irradiação do LED

O dispositivo de LED e os parâmetros utilizados foram descritos na tabela 1.

Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos do LED.

Potência Óptica	160 mW
Comprimento de onda	660 nm
Regime	Emissão Contínua
Energia total	24 J
Exposição radiante	5,8 J/cm ²
Irradiância	38,5cmW/cm ²
Área do feixe	4,15 cm ²

Modo de aplicação	Pontual
Tempo de exposição	150 segundos

Os animais dos tempos 1h, 3h e 6h foram tratados com o LED apenas uma vez, 30 minutos após a inoculação da salina ou veneno. Os animais do tempo de 24h foram tratados 30 min e duas horas após a inoculação da salina ou veneno.

2.5 Dosagens Bioquímicas

A coleta do sangue dos animais foi realizada por meio de punção da veia cava, em tubos sem anticoagulante, que foram imediatamente centrifugados a 3.000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos, para separação do soro dos outros elementos sanguíneos. O soro foi separado em tubo eppendorf e as análises das enzimas, TGO, FAL, CPK e LDH, foram realizadas, em duplicata, com o auxílio do equipamento automatizado AU680 da Beckman Coulter® que realiza as dosagens por meio de ensaios espectrofotométricos.

2.6 Análises Hematológicas

A coleta do sangue dos animais foi realizada por meio de punção da veia cava, em tubos de Na₂-EDTA para quantificação das plaquetas e Citrato de Sódio 3,5% para as análises de TP, TTPa e Fibrinogênio. A dosagem das plaquetas foi realizada no sangue total anticoagulado no Equipamento automatizado LH750 da Beckman Coulter®. Os parâmetros de TP, TTPa e Fibrinogênio foram realizados no Equipamento automatizado “Q” da marca Grifols®. O sangue coletado no tubo de citrato de sódio foi centrifugado a 2.500 rpm (rotações por minuto) por 10 min para separação do plasma em tubos eppendorf e análise do plasma citratado. Para a dosagem de fibrinogênio foi utilizado o método de Clauss que se baseia na utilização de excesso de trombina para coagulação do plasma citratado e dosagem da quantidade de fibrinogênio.

2.7 Análise Estatística

Para a análise dos dados foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) com auxílio do software “GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Foram realizados pós teste Tukey e considerado aceitável quando $p \leq 0,05$. Todas as amostras foram feitas em duplicatas e um experimento para cada grupo analisado.

3 RESULTADOS

3.1 Experimentos com a dose de 80 µg

3.1.1 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as plaquetas.

A figura 7 demonstra os resultados obtidos quanto ao biomarcador plaquetas. É possível constatar que apenas no grupo de 24 h houve diminuição significativa entre os grupos injetados com veneno, quando comparado com o grupo controle (Fig. 7D). Entretanto, não foi possível observar diferença significativa entre o grupo veneno e aquele que foi inoculado com o veneno e tratado com o LED (Fig. 7D).

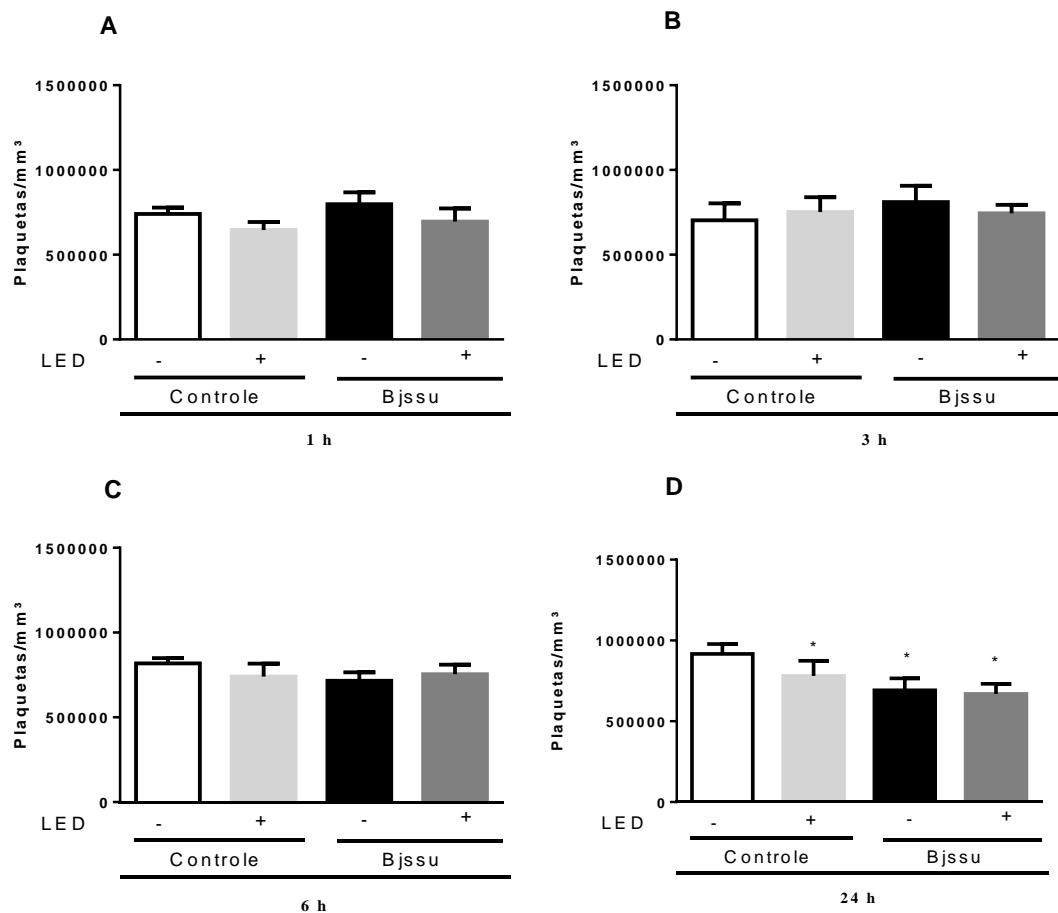


Figura 7: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as Plaquetas. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após o veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de plaquetas. * p<0,05 comparado com grupo controle

3.1.2 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina (TP).

Na figura 8 é possível verificar que não houve diferença estatística entre os grupos controle e os grupos inoculados com o veneno, exceção feita ao tempo de 24 h, em que é possível observar um aumento do tempo de protrombina do grupo inoculado com o veneno e tratado com o LED.

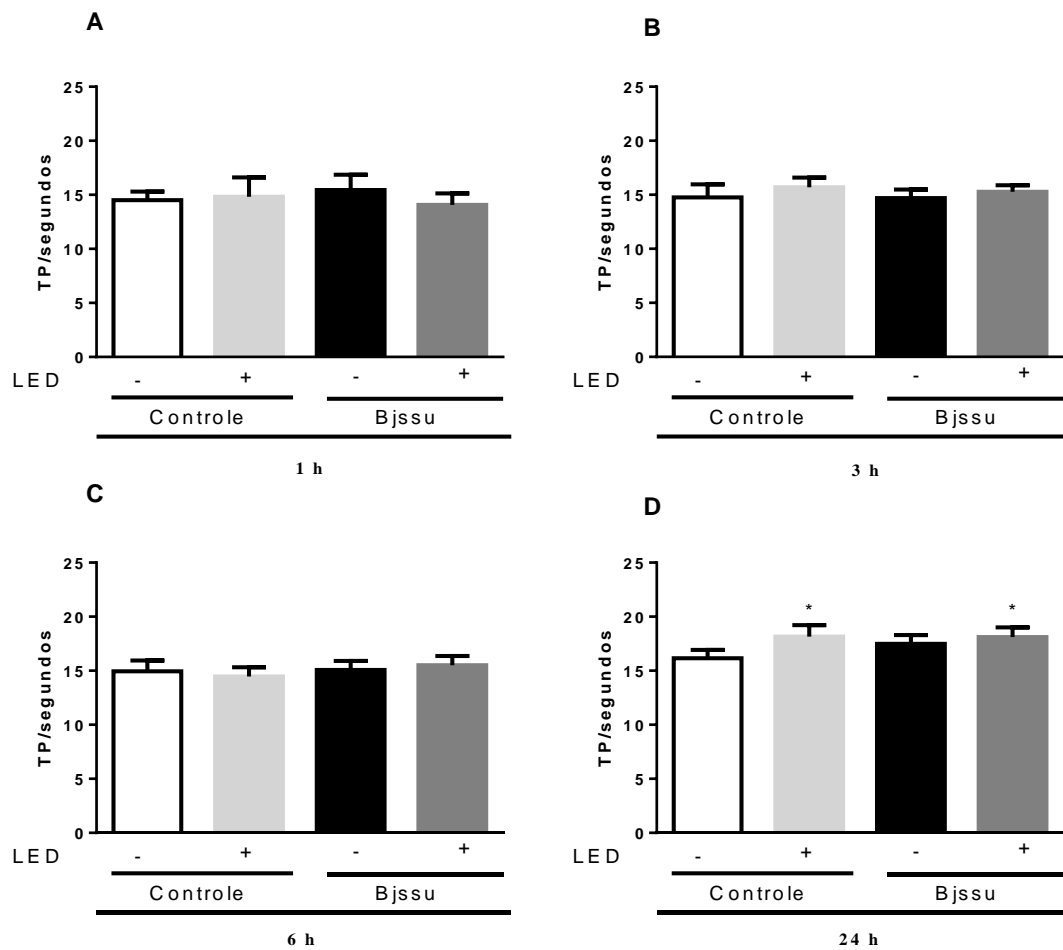


Figura 8: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após o veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem do Tempo de Protrombina. * p<0,05 comparado com grupo controle.

3.1.3 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina ativada (TTPa)

Quanto ao biomarcador Tempo de Tromboplastina Parcial ativada, verificou-se que nos tempos de 1h, 3h e 6h não houve diferença entre os grupos controle e veneno sobre esse biomarcador (Fig. 9 A, B e C). No tempo 24 h, foi possível constatar que houve uma redução dos tempos de Tromboplastina Parcial Ativada para os grupos veneno e o grupo inoculado com a salina e tratado com o LED quando comparado com o grupo controle.

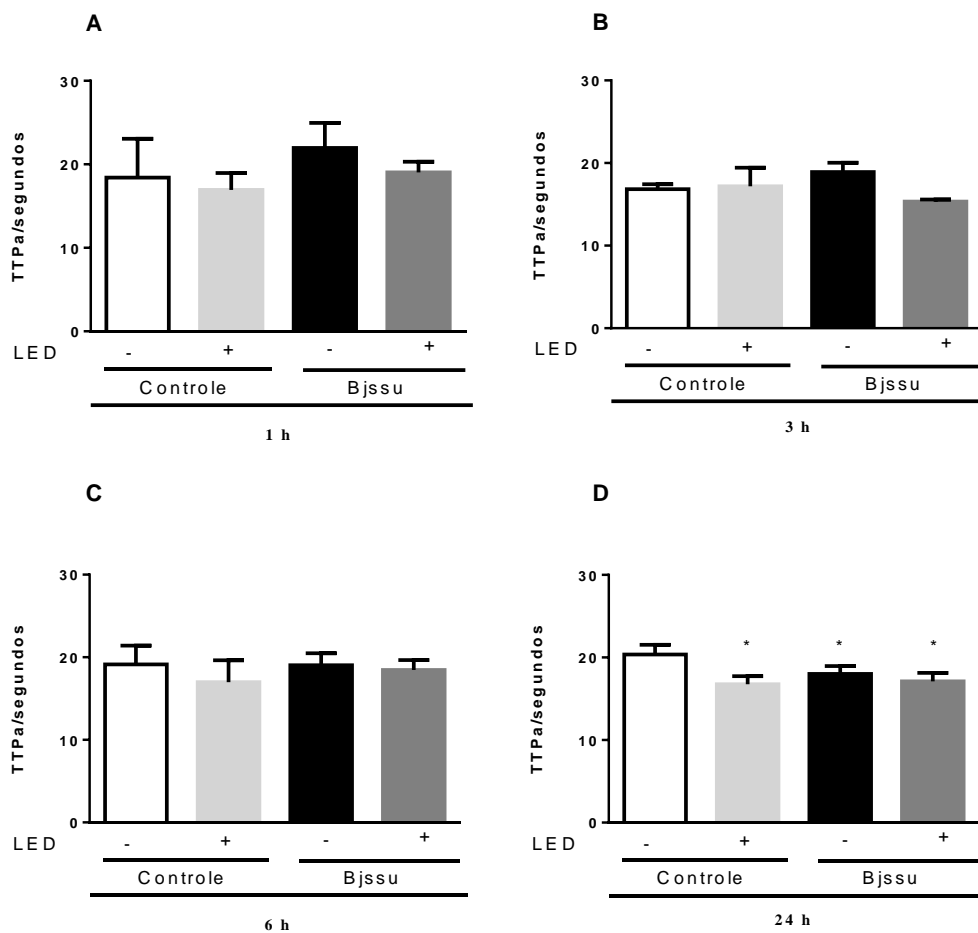


Figura 9: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após o veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. * p<0,05 comparado com grupo controle.

3.1.4 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o fibrinogênio.

A figura 10 demonstra os resultados obtidos quanto ao biomarcador fibrinogênio. É possível constatar que nos tempos de 1 e 3 h não houve diferença entre os grupos controle e veneno sobre esse biomarcador (Fig. 10 A e B). No entanto, no período de 6 e 24 h após a inoculação do veneno, houve aumento do fibrinogênio sanguíneo e que o tratamento com o LED aumentou significativamente as concentrações plasmáticas desse biomarcador (Fig. 10 C e D).

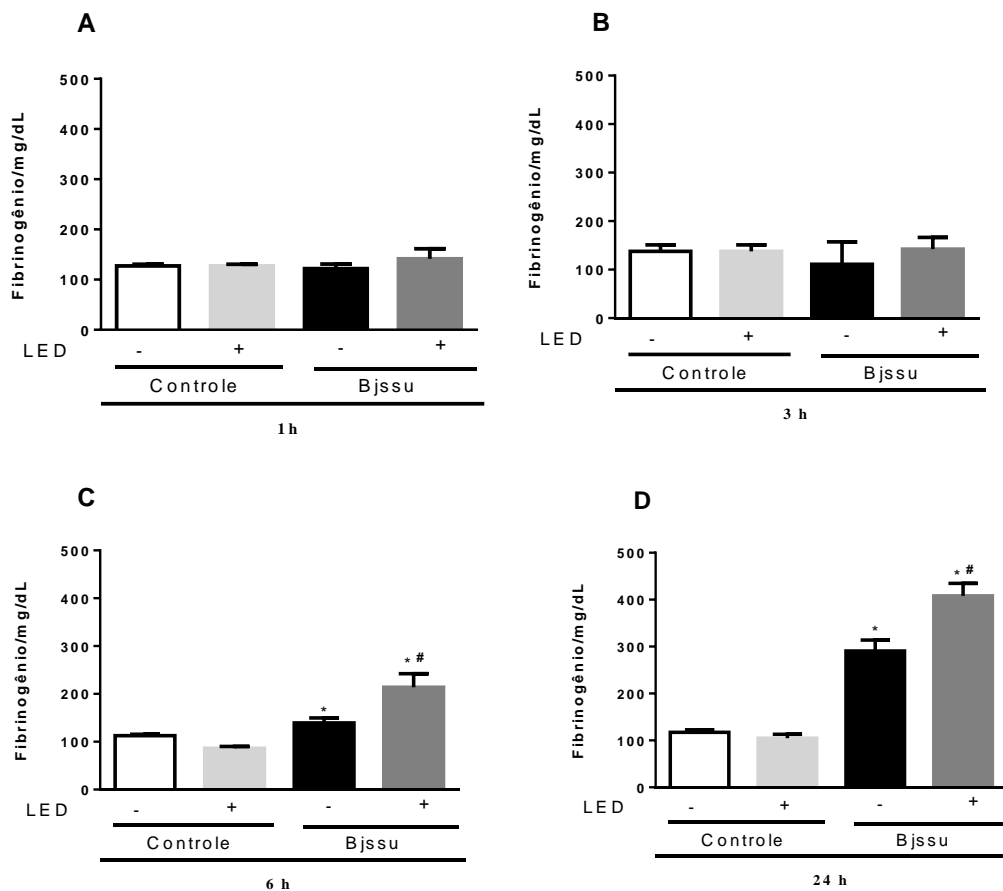


Figura 10: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Fibrinogênio. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após o veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de fibrinogênio. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.1.5 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO).

A Figura 11 expõe os resultados obtidos com a dosagem do biomarcador TGO. Verificou-se que nos tempos 1h e 24h houve um aumento das concentrações séricas de TGO nos animais inoculados com o veneno e tratados com o LED (Fig 11 A e D). Nos tempos 3h e 6h é possível observar aumento maior do TGO sérico dos animais inoculados com o veneno sendo que apenas no tempo 3h o grupo inoculado com o veneno e tratado com o LED teve as concentrações séricas diminuídas significativamente quando comparado com o grupo veneno.

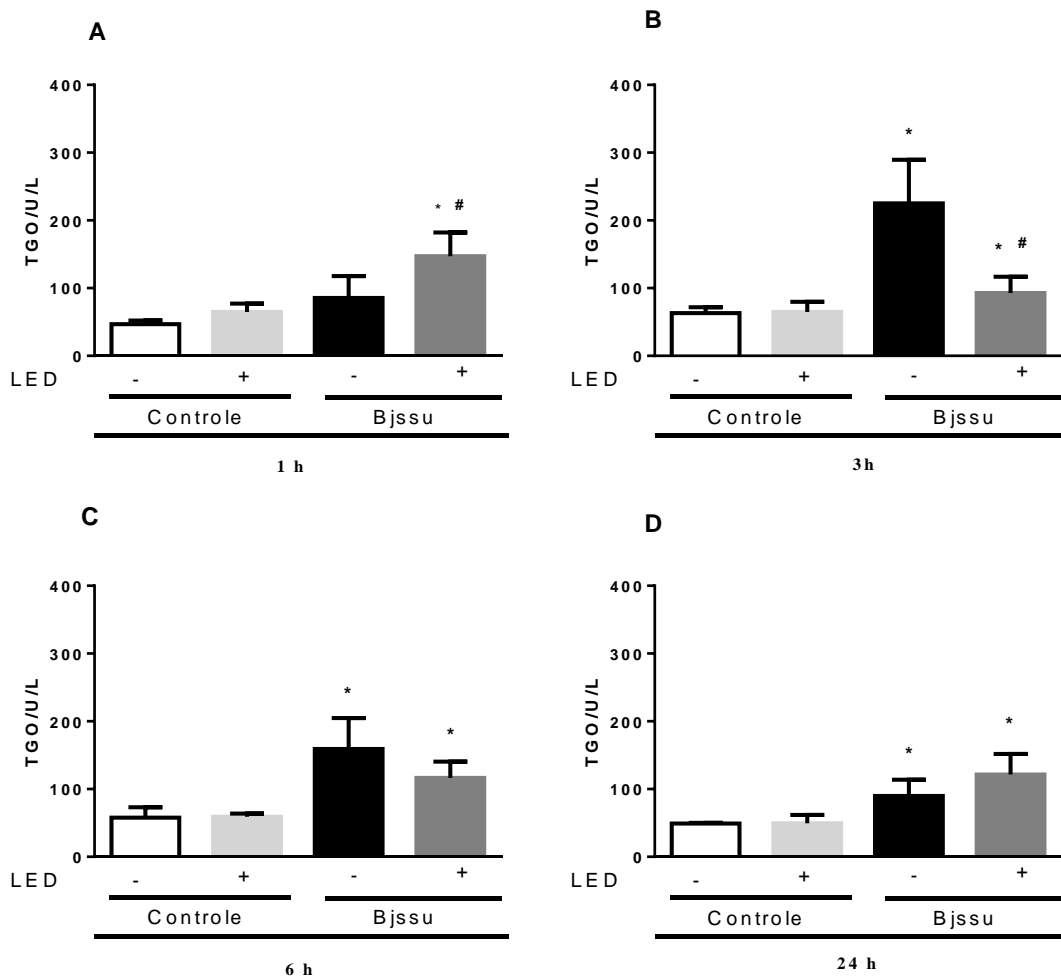


Figura 11: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o TGO. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de TGO. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.1.6 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a Lactato Desidrogenase (LDH).

A figura 12 demonstra os resultados obtidos quanto ao biomarcador LDH (Fig 8). Apenas no tempo de 1h (Fig 12 A) é possível observar aumento desse biomarcador entre os grupos tratados com o LED e os grupos veneno quando comparados com o grupo controle. Nos demais tempos não houve diferença significativa entre os resultados obtidos.

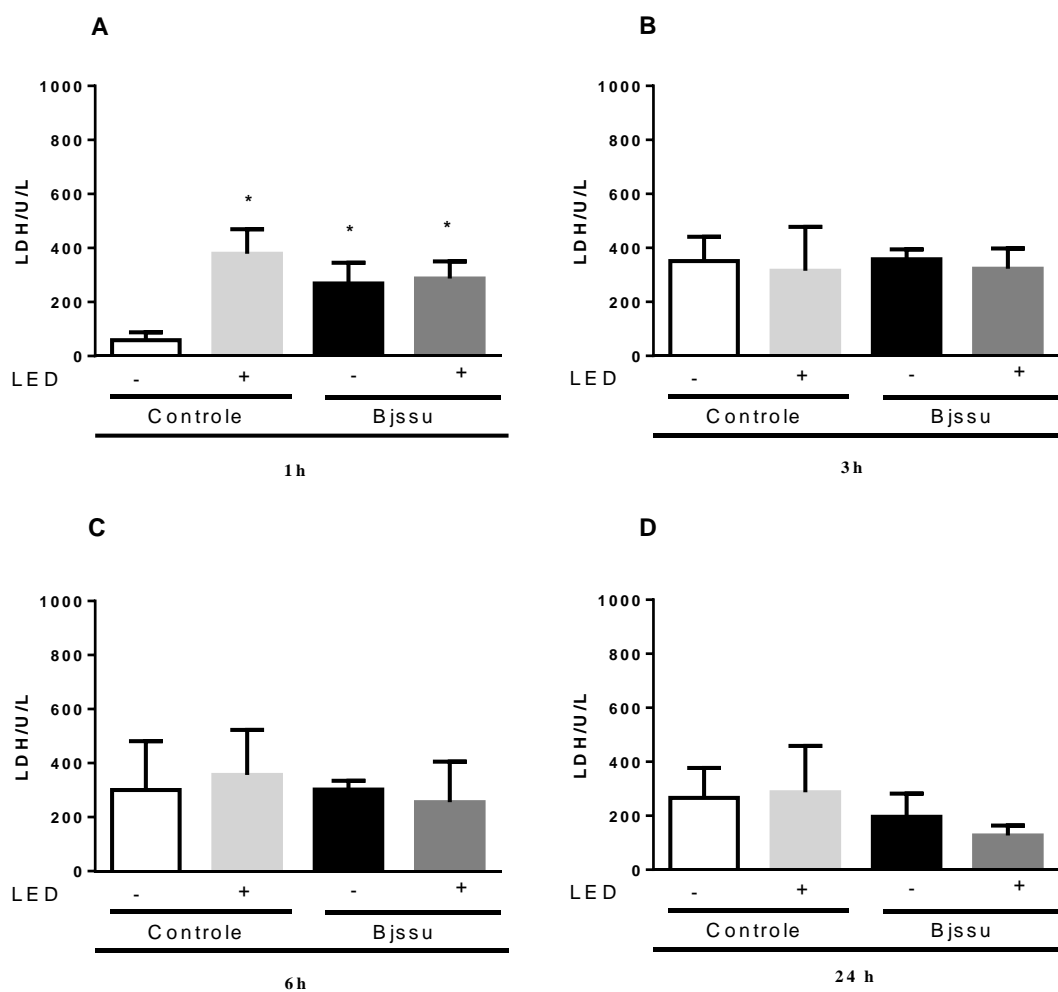


Figura 12: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o LDH. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de LDH. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

3.1.7 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a Creatinofosfoquinase (CPK).

A figura 13 demonstra os resultados obtidos quanto a dosagem do CPK (Fig. 13). No período de 1 h, o veneno aumentou significativamente os níveis séricos de CPK, e o LED foi capaz de reduzir esse efeito do veneno (Fig. 13 A). No tempo de 3 h, o veneno causou aumento dos níveis séricos de CPK em relação ao controle, entretanto não houve diferença significativa entre o grupo veneno e o grupo veneno tratado com o LED (Fig. 13 B). Para os tempos 6 e 24 horas, não se observou diferença significativa entre os grupos (Fig. 13 C e D).

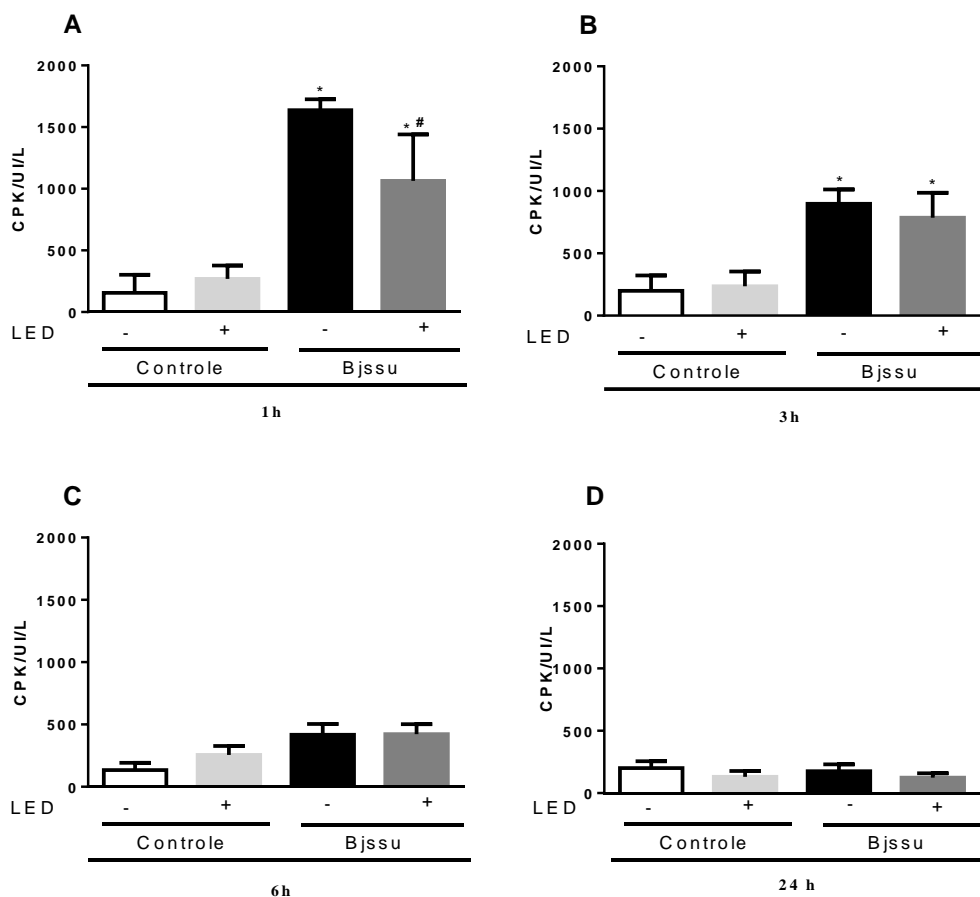


Figura 13: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o CPK. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de CPK. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.1.8 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a Fosfatase Alcalina (FAL).

Com relação ao biomarcador Fosfatase Alcalina, pela análise da Figura 14, observa-se que houve diferença significativa apenas nos tempos 1h e 6h (Fig. 14 A e C). No tempo 1h houve diminuição das concentrações séricas de FAL com a inoculação do veneno e o tratamento com o LED não demonstrou alteração nas dosagens. No tempo 6h, foi possível constatar que o veneno diminuiu as concentrações séricas de FAL e que o LED foi capaz de aumentar essas concentrações.

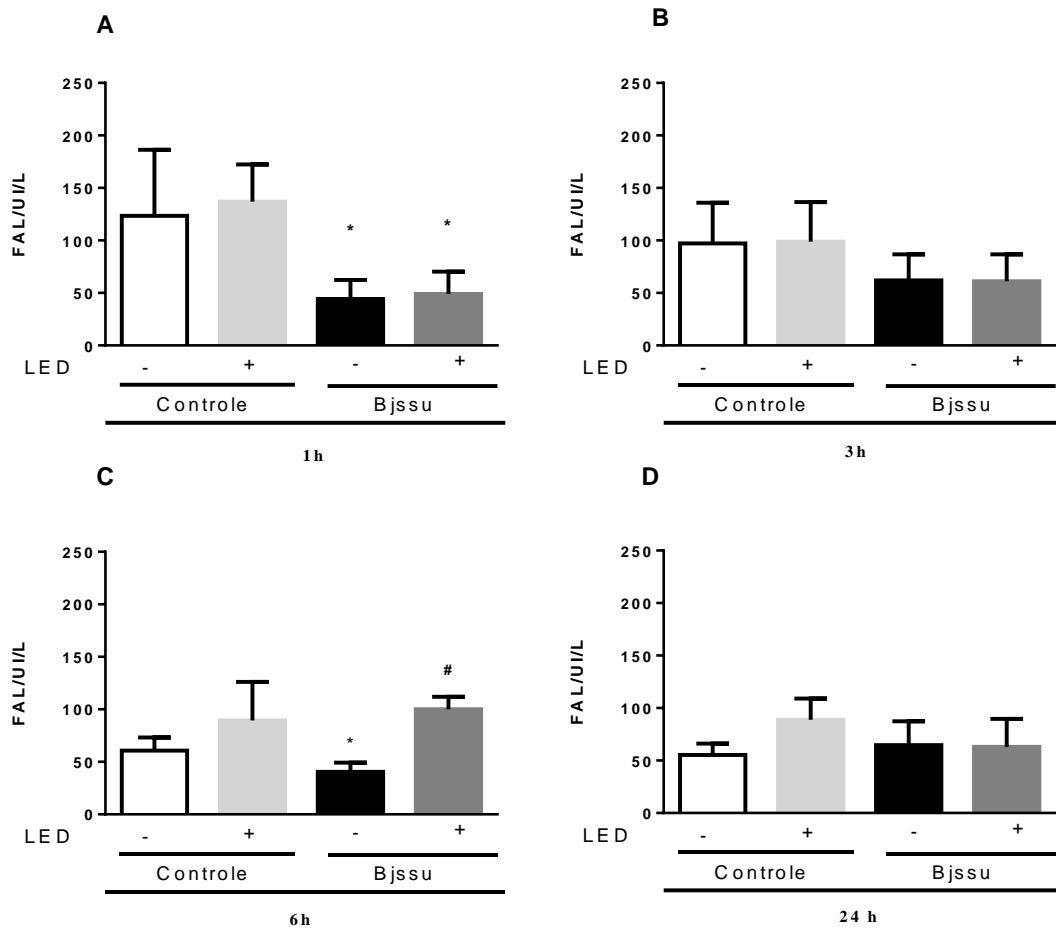


Figura 14: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a Fosfatase Alcalina. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (80 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação do veneno para a dosagem de FAL. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.2 Experimentos com a dose de 300 µg

3.2.1 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, sobre as plaquetas

Pela análise da Figura 15, é possível constatar que houve diminuição do número de plaquetas no tempo de 6 horas após a inoculação do veneno (Fig. 15B). Entretanto, não houve diferença entre o grupo tratado com o LED e o grupo que apenas foi inoculado com o veneno.

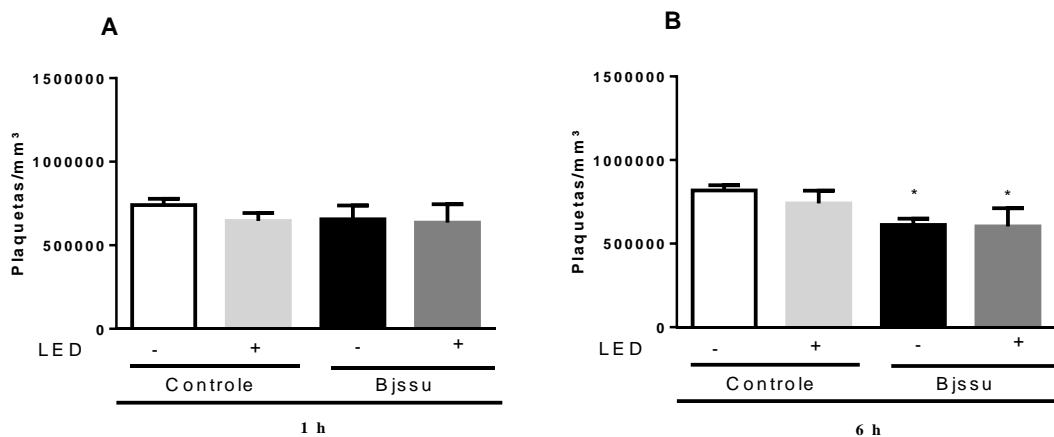


Figura 15: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as Plaquetas. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 μg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6h após a inoculação do veneno para a dosagem de Plaquetas. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

3.2.2 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina (TP)

A figura 16 demonstra a análise do Tempo de Protrombina. Podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos estudados em nenhum dos períodos analisados (Fig. 16 A e B).

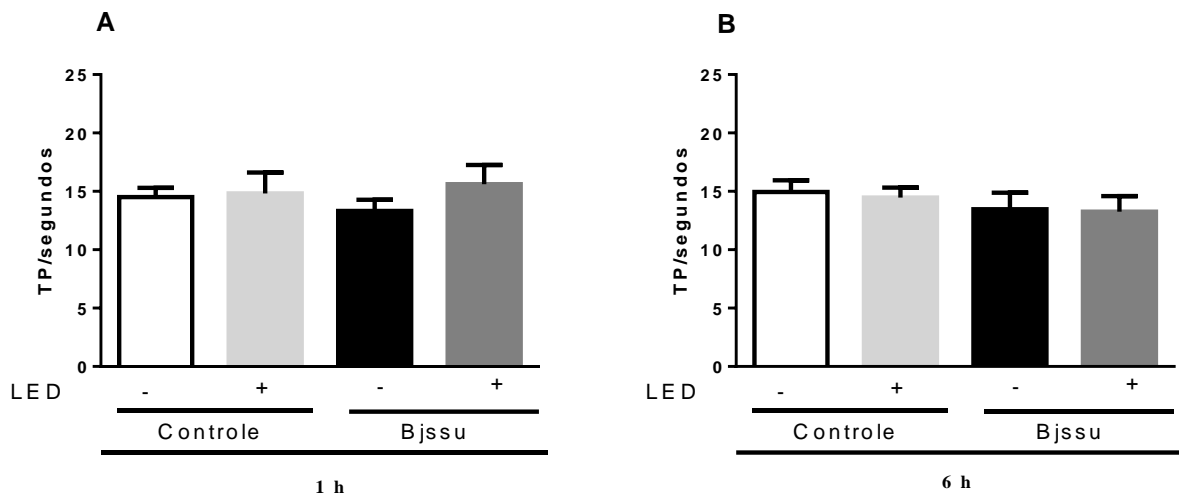


Figura 16: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Protrombina (TP). Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do Tempo de Protrombina (TP).

3.2.3 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa)

A Figura 17 demonstra que no tempo de 1h após a inoculação do veneno, houve prolongamento do Tempo de Tromboplastina Parcial, no grupo injetado com o

veneno e tratado com o LED quando comparado com os demais grupos (Fig. 17 A). No tempo de 6h não verificamos diferença entre os grupos estudados.

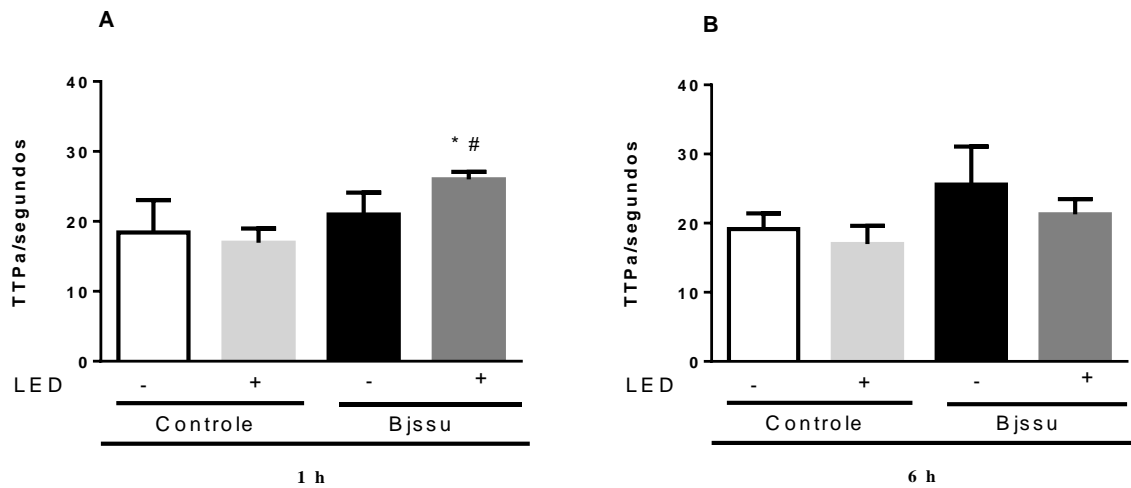


Figura 17: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa). Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa). * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.2.4 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Fibrinogênio

A Figura 18 expõe os resultados para o biomarcador Fibrinogênio. Não observamos diferença deste biomarcador no tempo de 1 h (fig. 18 A). No entanto, é possível perceber que houve um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio

no tempo de 6 h tanto para o grupo veneno quanto para o grupo inoculado com o veneno e tratado com o LED, sem que houvesse diferença significativa entre esses dois grupos (Fig. 18 B).

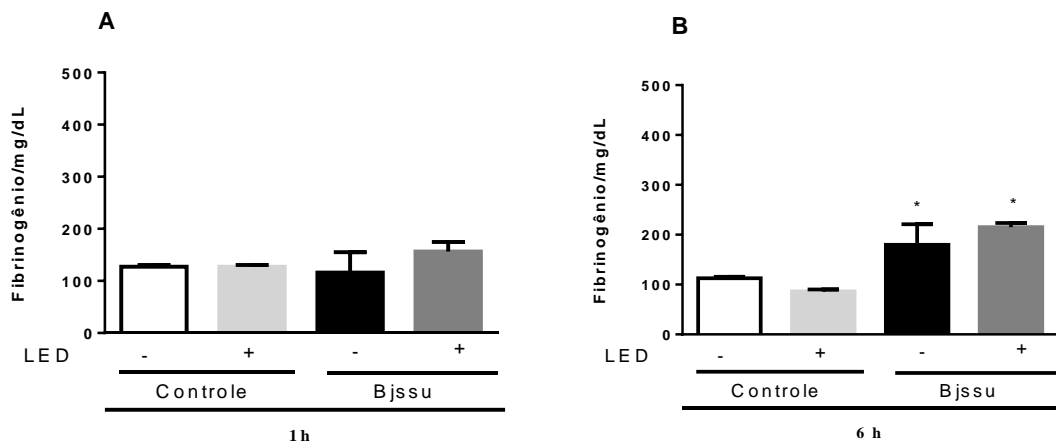


Figura 18: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o Fibrinogênio. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do Fibrinogênio. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

3.2.5 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o TGO

Ao se analisar a Figura 19 constata-se que houve aumento das concentrações séricas de TGO tanto nos tempos de 1h (Fig. 19 A) quanto de 6h (Fig. 19 B), mas que não houve diferença significativa entre o grupo veneno e o grupo veneno tratado com o LED.

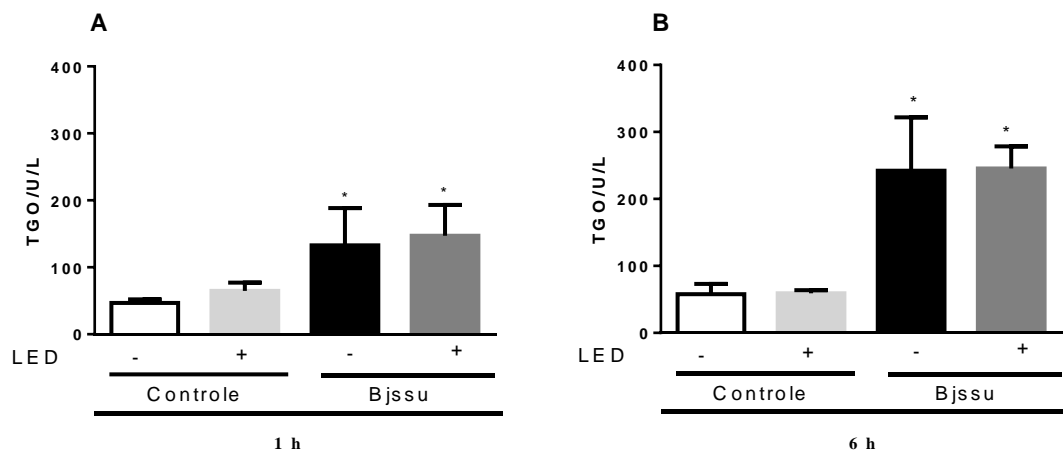


Figura 19: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o TGO. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do TGO. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.2.6 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o LDH

O biomarcador LDH aumentou consideravelmente suas concentrações tanto no tempo de 1h (Fig. 20 A) quanto no tempo de 6h (Fig. 20 AB) após a inoculação do veneno e tratamento com o LED.

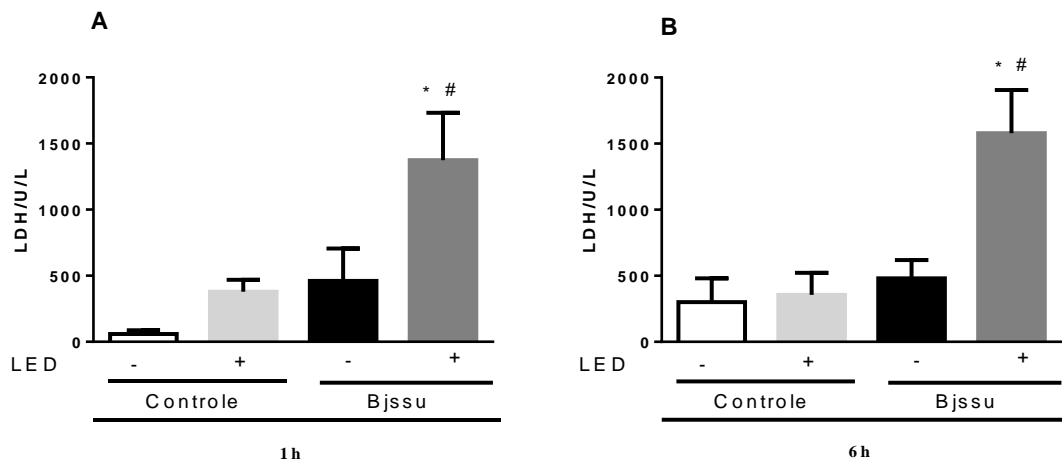


Figura 20: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre LDH. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do LDH. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle # $p < 0,001$ comparado com grupo veneno.

3.2.7 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre o CPK

A enzima CPK teve suas concentrações séricas aumentadas nos dois tempos analisados (Figura 21 A e B). Entretanto não houve diferença entre os grupos tratados com o LED e os grupos não tratados.

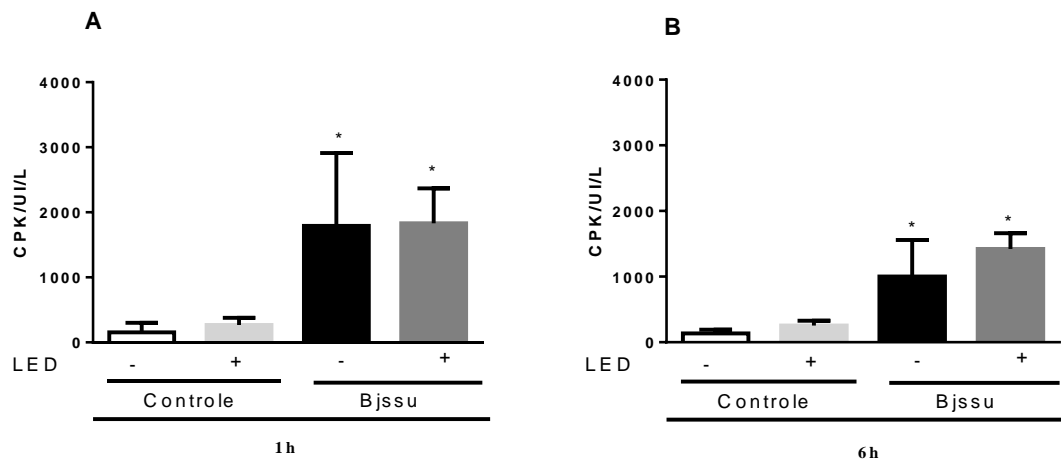


Figura 21: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre CPK. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do CPK. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle

3.2.8 Efeito do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a FAL

Quanto ao biomarcador Fosfatase Alcalina, a dose de 300 µg não foi capaz de aumentar as concentrações séricas quando comparado com o grupo controle. No entanto, no tempo de 1 hora houve redução significativa do grupo veneno tratado com o LED quando comparado com o grupo controle (Fig. 22 A).

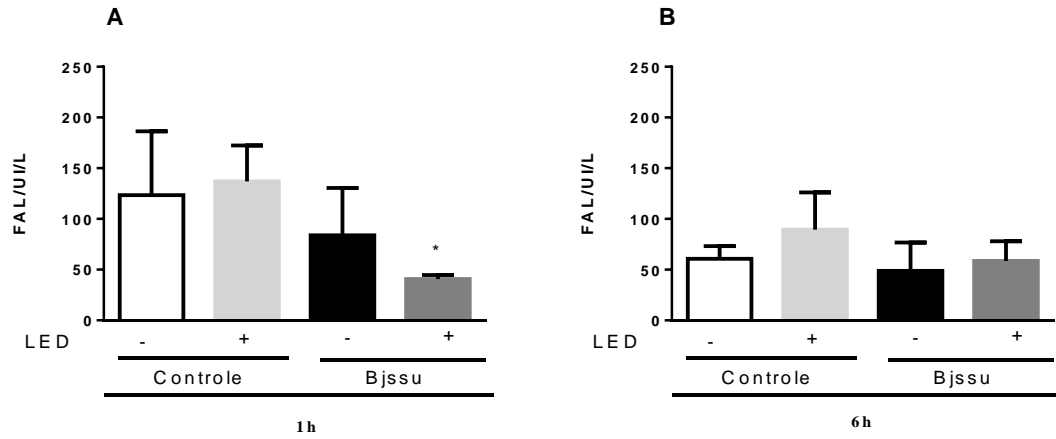


Figura 22: Efeito sistêmico do LED em lesão causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a FAL. Os animais foram injetados com o veneno de *B. jararacussu* (300 µg). O tratamento com o LED foi realizado 30 min após inoculação do veneno. O sangue foi coletado 1 e 6 h após a inoculação do veneno para a dosagem do LDH. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

3.3 Resumo dos Resultados Obtidos

Tabela 3: Apresentação de todos os resultados. De acordo com resultados de todos os experimentos realizados comparando os grupos: Controle, inoculado apenas com a salina; Veneno (dose 80µg), Veneno (dose 300 µg) e grupos veneno tratados com o LED, os resultados foram avaliados e segue sua interpretação, considerando significativo $p < 0,05$.

Biomarcador	Efeito esperado do Veneno	Efeito obtido do veneno dose 80µg x controle	Efeito obtido do veneno dose 300 µg x controle	Efeito obtido do LED dose 80 µg x veneno 80µg	Efeito obtido do LED dose 300 µg x veneno 300µg
Plaquetas	↓	1h -	1h -	1h	1h
		3h -	3h -		
		6h -	6h -	6h	6h
		24h ↓	24h -		

Tempo de Protrombina	↑	1h	1h	1h	1h
		-	-		
		3h	3h	-	-
		-	-		
Tempo de Tromboplastina Parcial	↑	6h	6h	6h	6h
		-	-		
Tempo de Tromboplastina Parcial	↑	24h	24h	-	-
		↑	-		
Tempo de Tromboplastina Parcial	↑	1h	1h	1h	1h
		-	-		
Tempo de Tromboplastina Parcial	↑	3h	3h	-	↑
		-	-		

		6h -	6h -	6h	6h
		24h ↓	24h -	-	-
Fibrinogênio	↓	1h -	1h -	1h	1h
		3h -	3h -	-	-
		6h ↑	6h ↑	6h	6h
		24h ↑	24h ↑	↑	-
		1h	1h	1h	1h

TGO	↑	-	↑	↑	-
		3h ↑	3h ↓		
		6h ↑	6h -	6h	6h
		24h ↑	24h -	↑	-
LDH	↑	1h ↑	1h -	1h	1h
		3h -	3h -	-	↑
		6h -	6h -	6h	6h ↑

		24h	24h	-	
		-	-		
CPK	↑	1h	1h	1h	1h
		↑	↓		
		3h	3h	6h	6h
		↑	-		
24h	24h	↑	-		
-	-				
FAL		1h	1h	1h	1h
		↓	-		
		3h	3h	-	-

		-	-		
	↑	6h ↓	6h ↑	6h	6h
		24h	24h	-	-
		-	-		

Legenda: ↓ Indica que houve diminuição significativa no resultado do experimento com relação ao seu grupo comparativo. ↑ Indica que houve aumento significativo no resultado do experimento com relação ao seu grupo comparativo. - Indica que não houve variação significativa no resultado do experimento com relação ao seu comparativo.

4 DISCUSSÃO

Já foi demonstrado que o veneno da serpente *B. jararacussu* apresenta em sua composição, substâncias relacionadas a achados clínicos hemorrágicos e mionecróticos, além de cardiotoxícos, nefrotóxicos e neurotóxicos. Enzimas coagulantes, metaloproteinases e fosfolipases A2 são os principais componentes que contribuem para essas atividades do veneno.²⁶

As plaquetas são responsáveis pela hemostasia primária desempenhando dois papéis importantes. Primeiro, formando agregados multicelulares ligados por coágulos de fibrina, criando assim uma barreira física que limita a perda de sangue pelos vasos. E segundo, acelerando a taxa pela qual as proteínas da cascata de coagulação é ativada, facilitando a geração de trombina e a formação de fibrina.²⁸ Sabe-se que os venenos botrópicos atuam nas plaquetas e vários componentes do veneno mostram altas similaridades estruturais e funcionais com diferentes ligantes naturais do receptor de adesão plaquetária afetando suas funções por diferentes mecanismos.²⁹

Tanto a inibição quanto a ativação das plaquetas pelos componentes do veneno contribuem para a coagulopatia induzida pelo veneno ao esgotar as plaquetas, culminando em trombocitopenia acentuada. (30, 31, 32, 33) Nossos resultados demonstraram uma redução de plaquetas 24 h após a inoculação do veneno na dose de 80 µg/músculo. O tratamento com o LED não foi capaz de modificar esse resultado. Foi relatado que o veneno de *Bothrops jararaca* na concentração de 40 µg/mL é suficiente para induzir a agregação plaquetária *in vitro*, e observou-se uma extensão máxima da agregação plaquetária a 80 µg em plaquetas de humanos³⁴ e coelhos³⁵ Ainda, foi demonstrado que a Bthtx-II, uma PLA2 isolada do veneno de *B. jararacussu*, é um potente ativador de reações plaquetárias.³⁶ Rosa et al., (2019) mostraram que a extensão da agregação plaquetária induzida pelo veneno de *B. jararaca* variou de acordo com as espécies testadas, de modo que as plaquetas de humanos exibiram extensões menores de agregação plaquetária do que as de camundongos. Ao se comparar os resultados obtidos com a inoculação de 80µg com resultados obtidos por meio dos experimentos realizados com a dose de 300 µg, percebe-se que para o segundo caso, houve diminuição da quantidade de plaquetas no tempo de 6 h enquanto que para a dose de 80 µg essa diminuição ocorreu apenas após 24h da

inoculação do veneno, indicando que a quantidade de veneno inoculado é importante para a coagulopatia induzida pelo veneno estudado.

As coagulopatias podem ser definidas como condições nas quais a capacidade de formação do coágulo sanguíneo encontra-se prejudicada. Desordens na coagulação representam as manifestações clínicas principais dos acidentes ofídicos que levam a danos severos e altos níveis de mortalidade. As alterações relacionadas à coagulação, induzidas pelo veneno de serpentes, é caracterizada pelo consumo de fatores da coagulação, como fibrinogênio e plaquetas o que favorece o aparecimento de hemorragias locais e à distância além de danos teciduais.³⁷ Neste sentido, as serpentes do gênero *Bothrops* tem a capacidade de afetar profundamente a química sanguínea através da ação procoagulante da ativação do fator X e da ativação da protrombina.⁴² Em 1979, Nahas e colegas realizaram um estudo comparativo de 26 espécies de *Bothrops* e relataram que as funções de ativação de protrombina ou fator X estavam presentes em todas as espécies de *Bothrops*, além da capacidade de coagular diretamente o fibrinogênio, mas com altos graus de variabilidade dentro do gênero.⁴⁰ Além disso, estudos sobre variações intra e interespecíficas nos venenos de *Bothrops* relataram diferenças nos componentes procoagulantes entre as espécies e nas populações de uma determinada espécie.⁴¹

Através da análise do Tempo de Protrombina e do Tempo de Tromboplastina Parcial, é possível avaliar qual o tempo necessário para a formação do coágulo, em sangue pobre em plaquetas coletado com anticoagulante citrato de sódio. O prolongamento dos tempos de trombina e tromboplastina Parcial indicam possíveis coagulopatias relacionadas às vias extrínseca e intrínseca da coagulação, respectivamente. Alguns estudos recomendam o Tempo de Protrombina como marcador prognóstico em pacientes envolvidos em acidentes com serpentes peçonhentas devido ao baixo custo e disponibilidade na maioria dos centros de atendimento médico.³⁸

Após análise dos resultados obtidos para o Tempo de Protrombina, foi possível verificar que apenas 24 h após a inoculação do veneno, houve aumento discreto do tempo de protrombina do grupo inoculado com o veneno e tratado com o LED, sendo que este aumento também ocorreu no grupo inoculado com a salina e tratado com o LED. Foi possível observar que os resultados se repetiram para os grupos de 1h e 6

h, para a dose de 300 µg. Em um estudo realizado com a metaloprotease do veneno da serpente *B. moojeni*³⁷, injetada por via intravenosa na concentração de 3µg/Kg, observou-se que houve prolongamento do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial no período de 3 horas. Essa metaloprotease diminuiu as concentrações de fibrinogênio plasmático após uma hora da administração e houve reestabelecimento aos níveis normais no tempo de 6 h. Além dessas alterações hemostáticas, foi possível observar neste estudo que essa metaloprotease foi capaz de reduzir o quantitativo de plaquetas, componente sanguíneo crucial na cascata da coagulação, pelo período de três horas. Ao se analisar os resultados obtidos quanto ao Tempo de Tromboplastina parcial, foi possível verificar que apenas no tempo 24 h houve diminuição desse marcador, para níveis basais normais, quando comparado com o grupo controle. Ainda, foi possível observar, para a dose de 300 µg, um prolongamento discreto no TTPa no tempo de 1 h. Provavelmente a dose de veneno de 80 µg não foi suficiente para ocasionar a ação hemorrágica esperada relacionada ao veneno da serpente *B. jararacussu*, que foi inoculado como um todo, diferentemente do estudo mencionado que utilizou a metaloprotease purificada.

Ao se observar os resultados obtidos, quanto ao biomarcador fibrinogênio, é possível constatar que nos tempos de 6 e 24 horas após a inoculação do veneno, houve aumento do fibrinogênio sanguíneo e que o tratamento com o LED aumentou as concentrações plasmáticas desse biomarcador. Para a dose de 300 µg houve um aumento na concentração plasmática de fibrinogênio no tempo de 6 h tanto para o grupo veneno quanto para o grupo inoculado com o veneno e tratado com o LED, sem que houvesse diferença entre esses dois grupos. Tais achados são discordantes dos resultados obtidos por Yamashita et. al. que após injetar, por via subcutânea e intravenosa, o veneno de *B. jararaca*, observou após 3 e 6 horas, redução significativa nos níveis de fibrinogênio plasmático.¹¹ Nosso resultado é intrigante, a redução das concentrações plasmáticas de fibrinogênio era esperada após inoculação do veneno, uma vez que há consumo do fibrinogênio plasmático para formação de fibrina e tentativa de alcançar a homeostasia.

O TGO ou AST é um biomarcador para o dano celular. É de grande importância no monitoramento da inflamação do fígado e da necrose tecidual, estados patológicos que causam liberação dessa enzima na corrente sanguínea devido ao aumento da

permeabilidade da membrana celular.⁴² O TGO ou AST, é uma enzima produzida nos músculos cardíaco e esquelético, fígado, rins, pâncreas e hemácias. A elevação sérica desta enzima está associada ao processo de necrose tecidual e foi possível observar neste estudo que, para a dose de 80 µg, nos tempos 3 e 6 h houve aumento das concentrações desta enzima no grupo veneno, quando comparado com o grupo controle e que o tratamento com o LED no grupo do tempo 3 h foi capaz de reduzir as concentrações plasmáticas desse biomarcador. Para a dose de 300 µg, foi possível observar o aumento nas concentrações plasmáticas para os grupos inoculados com o veneno, mas não se observou diferença entre o grupo veneno e o grupo tratado com o LED para os tempos de 1h e 6h. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Sartim et al. que ao administrar a metaloprotease do veneno da serpente *B. moojeni* observou aumento dos níveis séricos de TGO nos tempos 3 e 6 horas após a inoculação.³⁶ Ainda, em estudos realizados por e Sousa. et al, utilizando veneno de *B. Atrox*, serpente de importância médica principalmente na região norte do país, em camundongos e ratos, demonstraram que houve aumento nas concentrações séricas de TGO após a inoculação do veneno.³⁹ No estudo realizado por Dourado et. al., 2017, em camundongos, no tempo de 3 h após a inoculação do veneno observou-se aumento considerável nas concentrações séricas de TGO e tratamento com os lasers HeNe e GaAs foram capazes de diminuir essas concentrações. Entretanto, nos tempos 12 e 24h após a inoculação do veneno não foi possível observar diminuição nessas concentrações quando o animal foi tratado com o laser HeNe.¹²

Outro marcador de lesão tecidual é a enzima LDH. Esta enzima está presente em grande quantidade no músculo esquelético e a liberação desta enzima na corrente sanguínea está associada ao efeito miotóxico do veneno. Foi possível observar que após uma hora da inoculação do veneno, houve aumento dos níveis de LDH, quando comparado com o grupo controle. Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo veneno e o grupo veneno tratado com o LED, bem como não houve diferença entre os grupos para os tempos 3 h, 6 h e 24 h., quando a dose utilizada foi de 80 µg. Para a dose de 300 µg observou-se que as concentrações de LDH aumentaram consideravelmente nos grupos inoculados com o veneno e tratados com o LED tanto para o tempo de uma hora quanto para o tempo de 6 horas. Resultados obtidos por Dourado et al 2017, mostraram aumentos significativos nos níveis séricos de LDH nos tempos de 3h, 6h e 24h após a inoculação do veneno. Além disso, observou-se que o

tratamento com o laser GaAs foi capaz de reduzir as concentrações séricas desta enzima dia após dia até a sua estabilização no sétimo dia e que por outro lado, o tratamento da lesão com o laser HeNe demonstrou resultados similares aos observados com o grupo veneno.¹²

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a dose usada de 5,8 J/cm² reduziu a citotoxicidade avaliada através do biomarcador CPK, no tempo de 1 hora após a inoculação do veneno. No estudo realizado por Dourado et al. 2017, observou-se que após a inoculação do veneno de *B. moojeni* no músculo gastrocnêmio de camundongos, houve aumento dos níveis séricos de CPK nos tempos de 3, 12 e 24 horas após a inoculação e que o tratamento com dois tipos diferentes de laser (GaAs) e (HeNe) diminuiu, em diferentes proporções, os níveis plasmáticos dessa enzima.¹² De acordo com nosso estudo, DOURADO *et al.*, (2003) e BARBOSA *et al.*, (2009) em um estudo *in vivo* verificaram que a terapia com laser nos comprimentos 904 nm e 685 nm e densidade de energia de 4 e 4.2 J/cm², respectivamente, foi capaz de reduzir significativamente a mionecrose induzida pelo veneno, demonstrado por histologia e confirmado por redução dos níveis de liberação de CPK.

Em nosso estudo observamos a liberação de CPK nos tempo de 1 e 3 h após a inoculação do veneno. No entanto, nos tempos de 6 e 24 h não observamos mais esse aumento. Era de se esperar que houvesse aumento nas concentrações séricas desse biomarcador de injúria tecidual, com a inoculação do veneno no músculo do animal. É possível que a dose de veneno utilizada em nosso estudo (80 µg) não tenha sido suficiente para causar lesão satisfatória para que ocorresse liberação desse biomarcador em períodos mais tardios (6 e 24 h).

Para a dose de 300µg também foi possível observar aumento nas concentrações séricas de CPK nos tempos de 1h e 6h após a inoculação do veneno. Entretanto, não foi possível observar efeito da aplicação do LED, como tratamento, nas concentrações desse biomarcador.

A fosfatase alcalina, por estar presente na maioria dos tecidos, também é um marcador de lesão tecidual. É possível observar que não houve diferença significativa nos resultados dos grupos 1 h, 3 h e 24 h. No grupo de 6 horas observa-se uma diferença significativa entre grupo veneno e grupo veneno tratado com o LED, em que é possível concluir que houve aumento das concentrações séricas deste

biomarcador. No estudo realizado por Dourado et al. 2017, houve aumento das concentrações séricas de FAL nos tempo 3 h, 6 h e 24 h após a inoculação do veneno e o tratamento com o laser do tipo HeNe mantiveram a atividade da fosfatase alcalina mais próxima da atividade observada nos grupos controle, quando comparado com o laser GaAs que foi capaz de manter os níveis desta enzimas, mais elevados, no tempo de 24h até 21 dias após a inoculação do veneno.¹² Essas diferenças podem estar relacionadas com a espécie animal utilizada, em nosso estudo usamos ratos e no estudo de Dourado et al. 2017, foi utilizado camundongos.

O presente estudo apresentou como limitação técnica a coleta sanguínea dos animais. Tanto a quantidade de sangue coletada como a maneira como é realizada a coleta da amostra biológica são fatores que influenciam significativamente nos resultados obtidos uma vez que amostras hemolisadas e coaguladas devem ser descartadas.

Diante dos resultados obtidos experimentos com a dose de 300µg de veneno nos tempos de 3h e 24h devem ser conduzidos com o intuito de comparar os resultados obtidos até o momento. Estudo comparativo do efeito sistêmico do LED e do efeito da soroterapia nos biomarcadores da hemostasia e da mionecrose podem ser realizados para comparação entre os tratamentos.

5 CONCLUSÃO

Após análise de todos os dados obtidos é possível concluir que o LED apresentou efeito protetor apenas para os biomarcadores CPK e TGO, diminuindo as concentrações séricas que foram aumentadas pela ação do veneno. Para os biomarcadores da hemostasia: Plaquetas, Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial, não houve efeito adverso ou protetor do LED e para o Fibrinogênio observou-se aumento plasmático com o tratamento, resultado inesperado que pode ser futuramente investigado. Para os outros biomarcadores da mionecrose, LDH e FAL, observou-se que o LED aumentou ainda mais as concentrações séricas dessas enzimas, fato que necessita de mais fundamentação experimental.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Snakebites – disease*. Disponível em: <<http://www.who.int/snakebites/disease/en/>>. Acesso em 19 mai. 2018.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Snakebites – disease*. Disponível em: <<https://www.who.int/snakebites/epidemiology/en/>>. Acesso em 23 jul. 2019
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Situação Epidemiológica – Dados*. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/28/2-Incidencia-Ofidismo-2000-2017.pdf>>. Acesso em 19 de mai. de 2018.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Situação Epidemiológica – Dados*. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/08/3-Obitos-Ofidismo-2000-2017.pdf>>. Acesso em 19 de mai. de 2018.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos*, 2001.
6. PINHO, F.M.O; PEREIRA, I.D. *Ofidismo*. Rev. Ass. Med Brasil 47 (1), 9-24, 2001
7. MILANI JR, R. et al. *Snakes bites by the jararacuçu (Bothrops Jararacussu): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil*. Q. J. Med 90, 323-334, 1997.
8. PIRES, W.L et al. *Effect of BjcUL, a lectin isolated from Bothrops Jararacussu, on human peripheral blood mononuclear cells*. Toxicology in vitro 41, 30-41, 2017.
9. SILVA, L.M.G et al. *Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom*. PLoS ONE 11(4), 1-16, 2016.
10. FERNANDES R.S et al. *Suramin counteracts the haemostatics disturbances produced by Bothrops jararaca snake venom*. Toxicon 49, 931-938, 2007.
11. YAMASHITA, K.M; ALVES, A.F; BARBARO, K.C; SANTORO, M.L. *Bothrops jararaca venom Metalloproteinases Are Essencials for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation*. PLOS Neglected Tropical Diseases 8, 1-12, 2014.
12. DOURADO D.M et al. *Effects of photobiomodulation therapy on Bothrops moojeni snake- envenomed gastrocnemius of mice using enzymatic biomarkers*. Lasers Med Sci 32, 1357-1366, 2017.
13. DOIN-SILVA, R.; BARANAUSKAS, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. *The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom*. Photochem Photobiol. 85(1), 9-63, Jan-Fev 2009.
14. DOURADO D.M.; MATIAS, R.; ALMEIDA, R.F.; DE PAULA, K.R.; VIEIRA, R.P.; OLIVEIRA, L.V.F.; CARVALHO, P.T.C. *The Effects of Low-Level Laser on muscle*

damage caused by *Bothrops neuwiedi* Venom. *J.Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 14, 423-434, 2008.

15. GUTIERREZ J.M.; OWNBY C. L.; ODELL G.V. *Pathogenesis of Myonecrosis Induced by Crude Venom and a Myotoxin of Bothrops asper*. *Experimental and molecular Pathology* 40, 367-379, 1984.

16. QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO FRANCESCHI, J. *Muscle necrosis and regeneration after envenomation by Bothrops jararacussu snake venom*. *Toxicon* 22, 339-346, 1984.

17. ALBUQUERQUE-PONTES et al. *Photobiomodulation Therapy protects skeletal muscles and improves muscular function of mdx mice in a dose-dependent manner through modulation of dystrophin*. *Lasers in Medical Science*, 2017

18. DOURADO, K.B.V.; JUNIOR L.C.C.; DE PAULO, R.J.F.; GOMES, A.C. *Ledterapia*. *Ensaio e Ciência: Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde* 15(6), 231-248, 2011.

19. NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A.M.; CARLOS, F.P.; LIMA, C.J.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. *Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom*. *Lasers Med Sci.* 27(1), 65-70, 2012.

20. SILVA, E.M, GOMES, S.P.; ULBRICH, L.M.; GIOVANINI, A.F.; *Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos*. *Rev Sul-Bras Odontol.* 4, 29-35, 2007.

21. FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.D.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.D.G. *O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações*. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 32 (5) São Paulo, 2010.

22. LOWE, G.D.O., RUMLEY, A., MACKIE I.J., *Plasma Fibrinogen*. *Ann. Cli. Biochem.*, 2004;41:430-440.

23. FONTES, R.; CAVALARI, E.; NETO, L.V.; SHRANK, Y. SANTOS, A.S.; GOMES, D.M.; PINHEIRO, F.C.; PINHEIRO, M.F.C.; ARAUJO, P.B.M.C. *Alkaline Phosphatase: reference interval transference from CALIPER to a pediatric Brazilian population*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2018 Aug 54 (4):227-231.

24. REIS, P.R.D.M.; MESQUITA, M.M.D.; *Avaliação da determinação do tempo de protrombina em amostras de sangue colhidas por duas diferentes técnicas*.

25. ERICHSEN, E. S., VIANA L.D.G., FARIA R.M.D.D., SANTOS, S.M.E.S. V., *Medicina Laboratorial para o Clínico*. Belo horizonte: Coopmed,2009

26. RODRIGUES, M.A.P., ET AL., Rat atrial responses to bothrops jararacussu snake venom, *Toxicology* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.06.010>

27. Saúde Md. PORTARIA Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. 2016 Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html> Acesso em 23 jul. 2019
28. COLMAN R.W., J. HIRSH, V.J. MARDER, E.W. SALZMAN R.W. COLMAN, V.J. MARDER, E.W. SALZMAN, J. HIRSH (Eds.), Haemostasis and Thrombosis: Overview of Hemostasis, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1987, pp. 3–17
29. TEIXEIRA C, FERNANDES CM, LEIGUEZ E, CHUDZINSKI-TAVASSI AM. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation. *Front Immunol.* 2019 Sep 4;10:2082
30. DU XY, SIM DS, LEE WH, ZHANG Y. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cells Mol Dis.* (2006) 36:414–21. doi: 10.1016/j.bcnd.2006.03.001
31. DE QUEIROZ MR, DE SOUSA BB, DA CUNHA PEREIRA DF, MAMEDE CCN, MATIAS MS, DE MORAIS NCG, ET AL. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon.* (2017) 133:33–47. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.04.013
32. MATSUI T, HAMAKO J, TITANI K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. *Toxins.* (2010) 2:10–23. doi: 10.3390/toxins201001010
33. ROSA JG, DE ALBUQUERQUE CZ, MATTARAIA VGM, SANTORO ML. Comparative study of platelet aggregation and secretion induced by *Bothrops jararaca* snake venom and thrombin. *Toxicon.* (2019) 159:50–60. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.01.003
34. DAVEY M.G., LUSCHER E.F. *Actions of some coagulant snake venoms on blood platelets.* *Nature.* 1965 Aug 14; 207 (998):730-2
35. ZINGALI R.B., CARLINI C.R., FRANCISCHETTI I.M., GUIMARÃES J.A. *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. 1990 May 1; 58(3):303-16.
36. FULY AL, SOARES AM, MARCUSSI S, GIGLIO JR, GUIMARÃES JA. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie.* 2004 Sep-Oct;86(9-10):731-9.
37. MARCO A.SARTIM, GABRIEL N.CEZARETTE, ANNA L.JACOB-FERREIRA, FABIANI G.FRANTZ, LUCIA H.FACCIOLI, SUELY V.SAMPAIO, Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease, *International Journal of Biological Macromolecules* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.146>
38. VALENTA J, STACH Z, PORIZKA M, MICHALEK P Analysis of hemocoagulation tests for prediction of venom-induced consumption coagulopathy development after *Viperidae* bite. *Bratisl Med J* 2019; 120 (8)
39. SOUZA C.A.D., KAYANOB A. M., SETÚBALA S.S., PONTESA A.S., FURTADOA J. L., KWASNIEWSKIA F. H., ZAQUEOA K. D., SOARES A. M. S., STÁBELI R.G., ZULIANIA, J.P. *Local and systemic biochemical alterations induced by Bothrops atrox snake venom in mice.* *J Venom Res,* 2012, Vol 3, 28-34

40. NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* **1979**, *41*, 314–328.

41. FURTADO, M.F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* **1991**, *29*, 219–226.

42. SOUSA , L. F., ZDENEK, C. N., DOBSON J.S., BROUW B.O.P.D., COIMBRA F.C.P., GILLETT, DEL-REI T.H.M., CHALKIDIS H.D.M., SANT'ANNA S. , ROCHA M.M.T.D., GREGO K., CARDOSO S.R.T., SILVA A.M.M.D., FRY B.G., *Coagulotoxicity of Bothrops (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation*. *Toxins* 2018, *10*, 411.

ANEXO 1

Flavia

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da Fotobiomodulação nos biomarcadores da hemorragia e da mionecrose após envenenamento com o veneno da serpente *Bothrops jararacussu*", protocolada sob o CEUA nº 3593120618 (ID 000022), sob a responsabilidade de **Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 12/06/2018.

We certify that the proposal "Effects of Photobiomodulation on the biomarkers of hemorrhage and myonecrosis after envenomation with *Bothrops jararacussu* venom", utilizing 80 Isogenics mice (80 males), protocol number CEUA 3593120618 (ID 000022), under the responsibility of **Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/12/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 09/2020

Área: Medicina

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 6 a 10 semanas N: 80

Linhagem: Balb/c

Peso: 20 a 30 g

Local do experimento: O experimentos serão realizados no laboratório de biologia celular da Universidade Nove de Julho.

São Paulo, 12 de junho de 2018



Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho

ANEXO 2



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 20 de fevereiro de 2019
CEUA N 3593120618

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Stella Regina Zamuner
Área: Medicina

Título da proposta: "Efeitos da Fotobiomodulação nos biomarcadores da hemorragia e da mionecrose após envenenamento com o veneno da serpente Bothrops jararacussu".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNINOVE (ID 000005)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 29/janeiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitação de mudança da espécie e gênero dos animais utilizados. -Seguindo a linha de pesquisa do nosso grupo avaliamos o efeito do laser de baixa intensidade nos efeitos causados por venenos botrópicos. No trabalho aprovado recentemente (CEUA nº 3593120618) por esse CEP pretendemos avaliar o efeito do laser de baixa intensidade nos biomarcadores de mionecrose e hemorragia. No projeto atual, propusemos avaliar vários biomarcadores tanto de mionecrose quanto de hemorragia em camundongos Balb/C e para isso iremos utilizar o sangue dos animais. -Antes de iniciar o projeto fizemos um piloto com camundongos fêmeas Balb/C para descarte originadas do Biotério da Uninove e pudemos constatar que a quantidade de sangue coletada de um animal não é suficiente para a realização de todos os testes que propusemos fazer. Portanto o motivo de solicitarmos a mudança da espécie é a quantidade reduzida de sangue coletado pois não é suficiente para todas as análises pretendidas no projeto. Além disso, para as avaliações que iremos realizar, o gênero utilizado pode ser fêmea, e como tem uma maior disponibilidade de animais fêmea, pedimos a troca do gênero. - Para não ter que aumentar o número de animais (para conseguir a quantidade necessária de sangue para a realização de todos os testes bioquímicos) gostaríamos de solicitar a mudança de espécie e gênero dos animais. O projeto é exatamente igual ao aprovado, mas gostaríamos de solicitar ratas Wistar fêmeas ao invés de camundongos machos balb/C. - O projeto a ser realizado será idêntico ao aprovado (CEUA nº 3593120618). As únicas modificações são as decorrentes da troca de espécie e gênero estão descritas abaixo (dosagens de anestésico / acondicionamento dos animais de acordo com a espécie). O projeto é idêntico ao aprovado com os mesmos 4 grupos compostos por um n de 5 animais por grupo (20/grupo), realizados em 4 tempos diferentes 1, 3, 6 e 24 horas, no total 80 animais. Como, para a realização de todos os testes previstos no projeto, estávamos prevendo a repetição do experimento, devido a pequena quantidade de sangue coletado, resolvemos mudar a espécie e gênero. Assim, com essa emenda será permitida a realização de um projeto otimizando a quantidade de sangue coletado. Anestésico/relaxante muscular para eutanásia Dose letal de anestésico: Fármaco:- Quetamina Via de administração: Intraperitoneal Dose (UI ou mg/kg): 400mg/Kg (3x a dose usual) Dose letal de relaxante muscular: Fármaco:- Xilasina Via de administração: Intraperitoneal Dose (UI ou mg/kg): 40mg/Kg (3x a dose usual) Dimensão da caixa de instalação das ratas: 20x15x30 cm Quantidade de animais por caixa= 6 Peso dos animais: 250 [] 300 g".

Comentário da CEUA: "A emenda do projeto foi considerada aprovada, visto que previa apenas a alteração de camundongos por ratos. O projeto já tinha sido aprovado anteriormente. A metodologia foi mantida.".

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho