

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**GABRIELA RUSSO SOEIRO CAMPOS**

**Efeito da fotobiomodulação sobre macrófagos submetidos à ação  
do veneno de *B. jararacussu***

**São Paulo, SP  
2020**

**GABRIELA RUSSO SOEIRO CAMPOS**

**Efeito da fotobiomodulação sobre macrófagos submetidos à ação  
do veneno de *B. jararacussu***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho para obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Dra. Stella Regina Zamuner**

**São Paulo, SP  
2020**

Campos, Gabriela Russo Soeiro.

Efeito da fotobiomodulação sobre macrófagos submetidos à ação do veneno de *B. jararacussu*. / Gabriela Russo Soeiro Campos.. 2020. 47 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

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

*Bothrops*. 2. Citocinas. 3. Inflamação. 4. Macrófa fotobiomodulação.

Zamuner, Stella Regina. II. Título.

CDU 616



São Paulo 20 de fevereiro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: GABRIELA RUSSO SOEIRO CAMPOS

Título da tese: EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE MACRÓFAGOS SUBMETIDOS À AÇÃO DO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU.

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Membro: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DALBONI

Membro: PROFA. DRA. MARILIA DE ALMEIDA CORREIA

Membro: PROFA. DRA. LUIS ROBERTO DE CAMARGO GONÇALVES

Dedico,

Aos meus pais, família e amigos que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e ao Programa de Medicina pelo ambiente criativo e amigável que ela proporciona e à Capes pela bolsa de estudo.

À Professora Doutora Stella Regina Zamuner, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão do doutorado. A minha colega de grupo, Luciana Miato, pelo apoio e grande participação nos dias experimentais.

A Professora Doutora Camila Dale, por possibilitar a realização de alguns experimentos em seu laboratório, assim como agradeço ao Professor Doutor Cogo pela doação do veneno utilizado.

Aos meus pais Evandro e Roberta e familiares pelo apoio psicológico, amor e por todo incentivo durante o curso.

Agradeço aos meus colegas de grupo que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza. À todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação. Aos meus técnicos e colegas de laboratório e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

## RESUMO

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* induz um conjunto de eventos inflamatórios graves, incluindo a migração de leucócitos e uma complexa rede de mediadores liberados no local. A infiltração de leucócitos é caracterizada por um influxo inicial de neutrófilos seguido por um infiltrado tardio de células mononucleares, que se acumula no local da injeção de veneno e nos tecidos adjacentes. Estudos realizados pelo nosso grupo, mostram que o tratamento com fotobiomodulação (FBM) associado a soroterapia diminui o influxo leucocitário, *in vivo*, melhorando todo um quadro inflamatório, porém ainda não se sabe o mecanismo pelo qual a fotobiomodulação age no quadro inflamatório associado ao veneno. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o mecanismo de ação da FBM em macrófagos RAW 264.7 incubados com veneno botrópico. Para isso, as células foram incubadas com veneno de *B. jararacussu* (*VBjsu*), e imediatamente irradiadas com Laser de baixa intensidade com seguintes parâmetros: comprimento de onda de  $\lambda$  660 nm, potência de 100 mW (densidade de potência de  $0,33 \text{ W/cm}^2$ ), área do feixe de  $1 \text{ cm}^2$ , com densidade de energia de  $4 \text{ J/cm}^2$  e tempo de 40 segundos, e foram incubados nos tempos de 1, 3, 6 e 24 h. Foram analisados o efeito da fotobiomodulação sobre a viabilidade e integridade celular. Ainda, foi analisado a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) por ensaio imunoenzimático e cálcio intracelular. Os resultados obtidos de curva dose-resposta não demonstraram diminuição da viabilidade celular em nenhuma concentração utilizada no período de 1 h, no período de 6 h todas as concentrações utilizadas demonstraram diminuição de viabilidade celular. A FBM causou aumento significativo na viabilidade celular, comparado ao grupo sem tratamento. O grupo *VBjsu* induziu liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  com diferença significativa em todos os tempos estudados, apresentando maior liberação no tempo de 3 h e de TNF- $\alpha$  no período de 1 e 6 h. Ainda, apresentou diminuição significativa na liberação de IL-10, no tempo de 6 e 24 h. A FBM significativamente diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$ , nos tempos de 1 e 6 h, e de IL-6, nos tempos de 3 e 6 h, para a citocina IL-1 $\beta$ , a FBM diminuiu os níveis em todos os tempos estudados, e aumentou a liberação de IL-10 no tempo de 6 e 24 h. O grupo *VBjsu* causou diminuição de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, quando

comparado ao controle. A FBM causou uma elevação significativa do  $Ca^{2+}$ . Esses dados sugerem que o efeito protetor da fotobiomodulação em macrófagos deve ser, pelo menos em parte, por diminuir as citocinas pró-inflamatórias e aumentar a anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** *Bothrops*, citocinas, inflamação, macrófagos, fotobiomodulação.



## ABSTRACT

*Bothrops* snake venom induces serious inflammatory events, including leukocyte migration and a complex network of mediators released. Leukocyte infiltration is characterized by an initial influx of neutrophils followed by a late infiltration of mononuclear cells, which accumulates at the injection site and in the surrounding tissues. Studies carried out by our group show that the treatment with photobiomodulation (PBM) associated with serotherapy decreases the leukocyte influx, *in vivo*, improving an inflammatory condition, but the mechanism by which photobiomodulation acts on the inflammatory reaction associated with the venom is unknown. Thus, the objective of this study was to evaluate the mechanism of action of PBM in RAW 264.7 macrophages incubated with botropic venom. For this, the cells were incubated with *B. jararacussu* venom (BjsuV), and immediately irradiated with Low level Laser with the following parameters:  $\lambda$  660 nm wavelength, 100 mW power (power density 0.33 W / cm<sup>2</sup>), beam area 1 cm<sup>2</sup>, with an energy density of 4 J / cm<sup>2</sup> and a time of 40 seconds, and were incubated at 1, 3, 6 and 24 h. The effect of PBM on cell viability was analyzed. In addition, the release of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10) was analyzed by immunoenzymatic assay and intracellular calcium. The results obtained from the response curve showed no decrease in cell viability at any concentration used in the period of 1 h, in the period of 6 h all concentrations used demonstrated a decrease in cell viability. PBM caused a significant increase in cell viability, compared to the untreated group. The BjsuV group induced the release of IL-6, IL-1 $\beta$  with a significant difference at all period of time studied, with greater release at 3 h and TNF- $\alpha$  at 1 and 6 h. In addition, it showed a significant decreased in the release of IL-10, within 6 and 24 h. PBM decreased levels of TNF- $\alpha$ , at times 1 and 6 h, of IL-6, at times 3 and 6 h, at IL-1 $\beta$ , decreased levels at all times studied, and increased the release of IL -10 at 6 and 24 h. The BjsuV group showed a decrease in measurement of intracellular Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, when compared to the control. PBM caused a significant increase in Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>. These data suggest that the protective effect of PBM on macrophages must be, at least in part, by decreasing pro-inflammatory cytokines and increasing anti-inflammatory.

**Keywords:** Bothrops, cytokines, macrophage, inflammation, photobiomodulation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição da espécie <i>B. jararacussu</i> no Brasil (Funasa, 2001)	7
<b>Figura 2.</b> Normalização da função celular, alívio da dor e cicatrização de feridas através do laser	12
<b>Figura 3.</b> Fluxograma do desenho experimental do trabalho	15
<b>Figura 4.</b> Efeito do veneno <i>B. jararacussu</i> na viabilidade de macrófagos.	20
<b>Figura 5.</b> Efeito do veneno <i>B. jararacussu</i> na integridade (descolamento) de monocamadas de macrófago Células Raw 264.7	21
<b>Figura 6.</b> Efeito da FBM sobre a viabilidade de macrófagos incubados com veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).Células Raw 264.7	21
<b>Figura 7.</b> Efeito da FBM sobre o descolamento celular de Células Raw 264.7 incubadas com veneno de <i>B. jararacussu</i> .	22
<b>Figura 8.</b> Efeito da FBM sobre a liberação de IL-6 por macrófagos.	23
<b>Figura 9.</b> Efeito da FBM sobre a liberação de IL-1 $\beta$ por macrófagos.	24
<b>Figura 10.</b> Efeito da FBM sobre a liberação de TNF- $\alpha$ por macrófagos.	25
<b>Figura 11.</b> Efeito da FBM sobre a liberação de IL-10 por macrófagos..	26
<b>Figura 12.</b> Efeito da FBM na concentração de cálcio intracelular de macrófagos RAW 264.7 causada pelo veneno <i>B. jararacussu</i> .	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca<sup>+</sup>- Cálcio

CCL3- Ligante 3 de quimiocina com motivo CC

CXCL2- Ligante 2 de quimiocina com motivo CXC

FBM- Fotobiomodulação

IL-10-Interleucina -10

IL-12- Interleucina 12

IL-1b - Interleucina -1 - beta

IL-23- Interleucina 23

IL-6 – Interleucina - 6

LBI - Laser de Baixa Intensidade

mRNA- RNA mensageiro

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandinas E2

PLA2 - Isoformas de fosfolipase A2

SVMPs- Metaloproteínas de Veneno de Serpentes

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

VBjsu- Veneno de *Bothrops jararacussu*

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1.		7
1.2.	Inflamação por veneno botrópico	9
1.3.	Soroterapia	10
1.4.	Fotobiomodulação (FBM)	11
1.5.	Fotobiomodulação e veneno	13
2.	OBJETIVOS	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1.	Desenho experimental	15
3.2.	Preparação do veneno	15
3.3.	Macrófagos RAW	264.7 15
3.4.	Cultivo Celular	16
3.5.	Preparação de monocamadas de macrófagos para ensaios com o veneno	16
3.6.	Métodos colorimétricos para determinação de viabilidade celular	16
3.6.1.	MTT	17
3.6.2.	Cristal violeta	17
3.7.	Fotobiomodulação com laser de baixa intensidade (LBI)	18
3.8.	Dosagem de Citocinas	18
3.9.	Medição de cálcio intracelular	19
3.10.	Análise Estatística	19
4.	RESULTADOS	20
4.1	Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu) na viabilidade de macrófagos	20

4.2 Efeito do veneno <i>B. jararacussu</i> (VBjsu) na integridade (descolamento) de monocamadas de macrófagos.	21
4.3 Efeito da FBM sobre a viabilidade de macrófagos incubados com veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).	22
4.4.Efeito da FBM sobre a integridade de macrófagos incubados com veneno de	22
4.5. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-6 por macrófagos, induzida pelo veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).	24
4.6.Efeito da FBM sobre a liberação de IL-1 $\beta$ por macrófagos, induzida pelo veneno de	24
4.7. Efeito da FBM sobre a liberação de TNF- $\alpha$ por macrófagos, induzida pelo veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).	26
4.8.Efeito da FBM sobre a liberação de IL-10 por macrófagos, induzida pelo veneno de	26
4.9.Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na concentração de cálcio intracelular causada pelo do veneno da serpente	27
5.	DISCUSSÃO 29
6.REFERÊNCIAS	BIBLIOGRÁFICAS 33

## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ocasionados por serpentes peçonhentas em regiões tropicais e subtropicais, são considerados um problema grave de saúde pública, devido sua alta taxa de mortalidade e morbidades <sup>1</sup>. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que entre 2,7 milhões de casos de envenenamento geram mortes entre 81.410 e 137.880 das pessoas afetadas, e que o triplo sofre amputações ou ficam incapacitados permanentemente ([www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en)).

Na América Latina, o maior número de acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, da família *Viperidae*, que são animais de grande importância em estudos epidemiológicos devido à grande quantidade de acidentes <sup>2,3</sup>. Cerca de 90% dos casos relatados no Brasil, são ocasionados por serpentes desse gênero <sup>1</sup>.

O envenenamento por *Bothrops* ocasiona dano tecidual e sistêmico com respostas muito rápidas (dentro de 15 min), sendo eles caracterizados por hemorragia, náuseas, vômitos, sudorese, reações inflamatórias (edema, dor e infiltração de leucócitos), hipotensão arterial, insuficiência renal, distúrbio de coagulação e em alguns casos ocorrem choque e necrose <sup>4,5,6</sup>. Os efeitos gerados pelo veneno, podem se agravar gerando perda de massa muscular, neuropatia e amputação<sup>7</sup>.

O veneno de uma serpente compõe-se principalmente de uma mistura complexa de proteínas e enzimas tóxicas, como fosfolipases A<sub>2</sub>, miotoxinas, metaloproteinases (SVMPs) hemorrágicas ou não hemorrágicas, serino proteases, neurotoxinas e citocinas<sup>8</sup>. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possui metaloproteinases, responsáveis por degradação de matriz extracelular, que ocasionam hemorragias seguidas de mionecrose e necrose arterial que são as consequências comuns em envenenamento por esse gênero <sup>9</sup>. A mionecrose se deve principalmente por uma miotoxina caracterizada por fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que segundo a literatura também está ligada ao processo inflamatório, pois se ligam e alteram a membrana plasmática das células <sup>10,11</sup>.

### 1.1. *Bothrops jararacussu* (VBjsu)

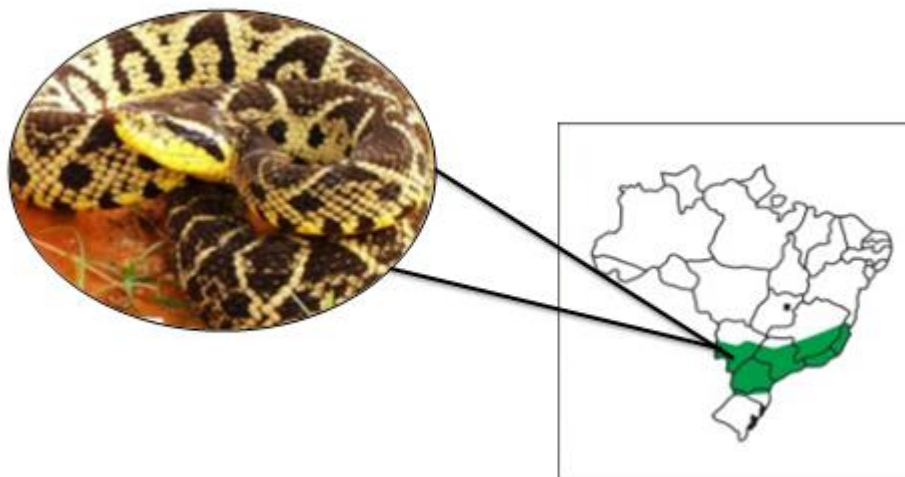


Figura 1. Distribuição da espécie *B. jararacussu* no Brasil (Funasa, 2001)

A *Bothrops jararacussu* é uma das serpentes que mais geram acidentes no Brasil, no sul da Bolívia, no Paraguai e no nordeste da Argentina. No Brasil a sua distribuição ocorre desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul. Essa serpente atinge cerca de 2,20 m de comprimento e é responsável por 0,8% a 10% de acidentes ofídicos no Brasil (fig. 1) <sup>12,13</sup>. O envenenamento causado pela *B. jararacussu* possui alto nível de letalidade devido a sua alta concentração de miotoxinas (30% total de agentes miotóxicos), a tornando uma das serpentes mais letais dentre o seu gênero<sup>14, 15</sup>. A ação local desse veneno não é efetivamente neutralizada pela soroterapia específica ou por outros soros produzidos para o gênero *Bothrops*<sup>16</sup>. A necrose é um dos eventos mais comuns e característicos causado pela mordida dessa serpente, devido às miotoxinas presentes que agem na membrana celular<sup>14, 17</sup>. Ao isolar as miotoxinas do veneno de *B. jararacussu* observa-se, que as proteínas presentes desenvolvem um papel importante na patogênese do tecido afetado, gerando edemas e grande infiltrado inflamatório<sup>10</sup>.

A resposta inflamatória é uma reação adaptativa que será desencadeada através de impulsos e condições prejudiciais ao organismo, como lesão tecidual ou infecções <sup>18</sup>. Independentemente do fator, a inflamação é uma resposta categorizada para restaurar homeostase, instituindo estágios de cura e reparo tecidual<sup>19</sup>. A inflamação vai ocorrer no tecido conjuntivo vascularizado, contendo células circulantes, plasma, vasos e componentes celulares e extracelulares. Essa resposta inflamatória vai ocasionar uma vasodilatação e permeabilidade vascular,



possibilitando um recrutamento de leucócitos e liberação de outros mediadores inflamatórios<sup>20, 21</sup>.

O processo inflamatório é uma resposta biológica essencial para defesa contra microrganismos e parasitas, sendo também uma solução inicial contra grande parte de lesões físicas. Como uma resposta imune geral, esse processo é elaborado e mediado por diferentes citocinas, que podem ter ação pró ou anti-inflamatória<sup>22, 23</sup>.

O processo inflamatório se divide em dois modelos, sendo eles crônicos e agudos. A inflamação aguda se desenvolve em um curto período, sendo seu pico entre 48 a 72 h fazendo uma transição de infiltrados, envolvendo alterações nos microvasos (vasoconstrição e vasodilatação), resultando na entrega sistematizada de componentes sanguíneos (leucócitos e plasma) para o local da lesão, possibilitando a fagocitose por células responsáveis e ocasionando dor e edema<sup>19</sup>. A resolução da inflamação e a fase de reparo envolvem a degradação de agentes pró-inflamatórios e a liberação de mediadores anti-inflamatórios, principalmente por macrófagos encontrados nos tecidos, assim como apoptose de granulócitos e remoção por monócitos. Essa fase é concluída pela sua eliminação através do sistema linfático, que vai promover a remoção dos resíduos líquidos e celulares do compartimento intersticial<sup>19, 24</sup>. A fase crônica ocorrerá se a fase aguda não neutralizar o agente infeccioso. Ela possui um longo período de duração, e se desenvolve entre a inflamação aguda e reparo tecidual, tendo como principais células precursoras os linfócitos e os macrófagos<sup>20, 22</sup>.

O macrófago na inflamação terá como suas principais funções, o reconhecimento do antígeno, a fagocitose e a imunomodulação através de citocinas<sup>20</sup>. Os macrófagos são células de origem mieloide, que nos tecidos podem ser ativados de maneiras variadas de acordo com as citocinas liberadas no local, com fenótipos M1 e M2<sup>25</sup>. O fenótipo M1, age de maneira pró-inflamatório, caracterizado por promover resposta imune tipo 1, tendo atividade fagocítica e aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatória (IL - 1 $\beta$ , IL - 6, TNF -  $\alpha$ , IL - 12 e IL - 23). O fenótipo M2, produz citocinas anti-inflamatórias, sendo predominantes no 3 dia da inflamação, e permanecem no tecido até 7 dias após a lesão, produzindo fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatória (TGF-  $\beta$  e IL-10)<sup>26,27,28</sup>.

Os macrófagos então possuem um papel importante na resposta inflamatória, uma vez que ele está presente em todas as fases de reparo, atuando na primeira fase com agente pro-inflamatório ocasionando mecanismo de remoção e reparo tecidual; na fase proliferativa, estruturam a angiogênese e atraem células que fazem a fibrogênese, e ao final do reparo substituem o tecido lesado por tecido conjuntivo <sup>25</sup>.

## 1.2. Inflamação por veneno botrópico

O envenenamento por serpentes do gênero *Bohtrops*, resultam em ações locais e sistêmicas. As ações locais são as mais habituais, sendo sugerido pela literatura que os efeitos patológicos são diretamente associados a uma complexa resposta inflamatória local, que pode potencializar o dano tecidual<sup>29, 30, 31, 32</sup>. Os efeitos ocasionados pela picada da *Bothrops*, sendo eles sistêmicos ou locais, estão correlacionados à presença de algumas classes de toxinas na composição de seu veneno, como as metaloproteinases e fosfolipases A<sub>2</sub>, que contribuem para os sintomas inflamatórios <sup>33</sup>.

A inflamação está constantemente relacionada ao envenenamento botrópico<sup>34</sup>. No caso da serpente *B. jararacussu*, foi demonstrado que a característica principal é a necrose muscular, devido a infiltração de células imunes, que vão fagocitar e secretar citocinas importantes no reparo tecidual<sup>35</sup>. Foi demonstrado em estudo *in vitro* que ao estimular células com toxinas do veneno de *B.atrox* (metaloprotease PI- Batroxase e a fosfolipase ácida A<sub>2</sub>- BatroxPLA<sub>2</sub>), ocorre a liberação de IL-6, IL-10 e PGE<sub>2</sub>, sugerindo envolvimento de macrófagos e mastócitos, mostrando que as toxinas presentes no veneno promovem resposta inflamatória<sup>36</sup>.

Dentre as células relevantes no mecanismo imunológico, estão os mastócitos e os leucócitos. Os mastócitos possuem uma quantidade exacerbada de mediadores inflamatórios de rápida liberação, atribuindo-se então um papel essencial no início de um processo inflamatório<sup>37, 38</sup>. Os leucócitos ao serem ativados, vão liberar mediadores inflamatórios, potencializando suas funções imunológicas, facilitando a regeneração, sendo essencial para a resolução da inflamação <sup>39</sup>.

A literatura mostra que ao isolar a fosfolipase A<sub>2</sub> (BthTxI e II e Piratoxina-I PrTX-I) dos venenos das serpentes *B. jararacussu* e *B. pirajai*, eles vão ocasionar

uma degranulação de mastócitos *in vitro* <sup>40</sup>. Recentemente foi demonstrado que ao estimular monócitos e macrófagos com os venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*, elas vão induzir uma proteína macrofágica 1-alfa (MIO-1 $\alpha$ ) e liberar IL-1 $\beta$ , associando produção de quimiocinas e citocinas após a estimulação do veneno <sup>29</sup>.

Experimentos com *B. atrox*, demonstram o aumento de número leucocitário no processo inflamatório, assim como o aumento de citocinas locais, como IL-6, IL-10, IL-12, mostrando um processo de resposta imune gerando febre, migração celular e regulação do perfil inflamatório <sup>41</sup>.

O composto de informações descritas, mostra a complexidade de mecanismos inflamatórios causados pelo gênero *Bothrops*, demonstrando a fragmentação dos estudos existentes.

### **1.3. Soroterapia**

O tratamento preconizado para os casos de acidentes botrópicos é a soroterapia com o antiveneno botrópico. A soroterapia exerce a função de neutralizar grandes quantidades de veneno circulante para minimizar ou anular os efeitos sistêmicos<sup>42</sup>, porém ele não age com eficiência nos efeitos locais. Alguns estudos mostram que a ação parcial da soroterapia no local, só é eficaz quando ela é administrada rapidamente após o acidente, sendo o período ideal para se aplicar o soro, entre as duas primeiras horas após o acidente<sup>43</sup>. Por falta de proteção local, sugere-se a procura de tratamentos alternativos, que possam ser agregados a soroterapia.

### **1.4. Fotobiomodulação (FBM)**

Desde 1960 a literatura estabeleceu o uso do laser como fonte terapêutica em variadas áreas médicas, devido a algumas particularidades específicas (monocromaticidade, colimação e coerência) que a diferenciam de uma luz comum<sup>44</sup>. A monocromaticidade significa que a luz laser emitida vai apresentar apenas um comprimento de onda. A coerência as ondas apresentam-se em fase no

tempo e no espaço, alinhadas entre si. A colimação se deve ao laser possuir feixes com ondas na mesma direção, com um mínimo ângulo de divergência<sup>49,50</sup>.

A FBM utiliza luz na região ótica de ~600-1000 nm, sendo ela monocromáticas ou quase-cromáticas, para que não ocorra ações térmicas ou destrutivas ao tecido<sup>51</sup>. As regiões óticas mais utilizadas na FBM são os comprimentos de onda infravermelho (770 -1200 nm) e vermelho (600 – 700nm), tendo maior penetração tecidual, causada pela menor absorção e dispersão pelos cromóforos<sup>28</sup>.

Por não ser um tratamento invasivo, a FBM possui uma longa extensão de sua aplicação, aliviando dor e agindo em processo cicatricial<sup>48</sup>. O alívio de dor e a cura, são proporcionados devido a ação do laser nas organelas celulares (mitocôndrias e membranas), que vão absorver fótons através de cromóforos dentro das células desencadeando reações químicas, normalizando a função celular e proporcionando alívio de dor e cura<sup>49,50</sup>.

A FBM apresenta eficácia na proliferação de fibroblastos, na regeneração de fibras musculares esqueléticas, melhora da síntese de colágeno, promovem efeitos analgésicos e diminuem inflamação<sup>51,52</sup>. Esses efeitos são gerados devido a ação em nível celular, tendo aceleração no transporte de elétrons na cadeia respiratória, aumentando a síntese mitocondrial de ATP, gerando um rápido aumento de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e modulação dos níveis de cálcio<sup>53,54,55</sup>. Outra de suas propriedades em um processo inflamatório é sua capacidade de alterar o fenótipo de células da linhagem de monócitos e macrófagos, onde a FBM pode diminuir marcadores do fenótipo M1 (mRNA de CCL3, CXCL2 e TNF $\alpha$ ) em macrófagos, tendo potencial explicativo dos efeitos anti-inflamatórios da FBM em reparo de feridas (fig. 2)<sup>55</sup>.

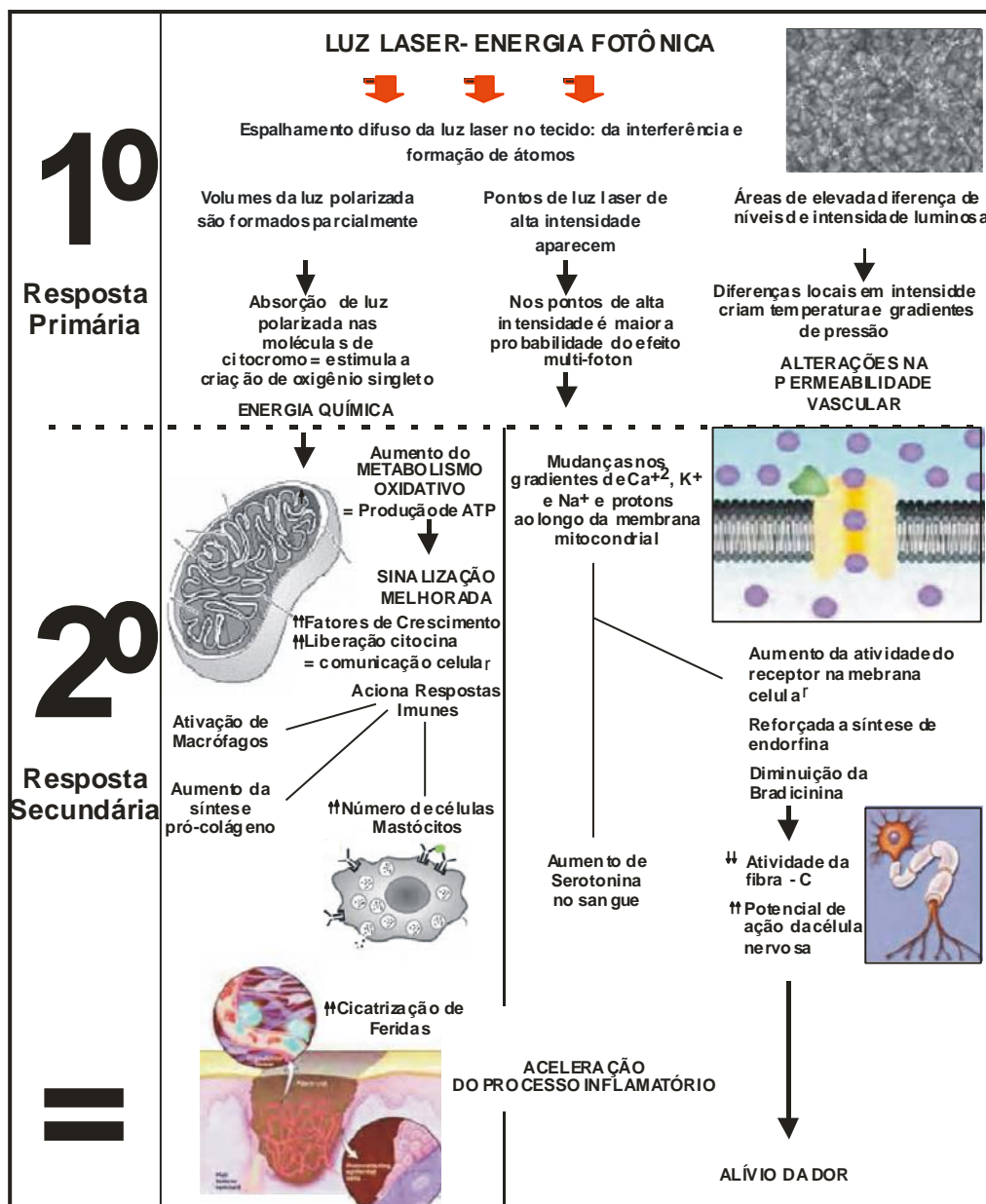


Figura 2. Os mecanismos primários dizem respeito à interação entre os fótons e moléculas em tecido, enquanto que os mecanismos secundários referem-se ao efeito das alterações químicas induzidas pelos efeitos primários. A estimulação da produção de ATP celular tem sido apontada como um dos efeitos mais 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).

## 1.5. Fotobiomodulação e veneno

Embora o mecanismo de ação do laser nas reações locais causadas pelo veneno botrópico não esteja muito bem estabelecido, a literatura mostra que a FBM é capaz de diminuir mionecrose, hiperalgesia, hemorragia, e o processo inflamatório, após a injeção de veneno botrópico. No processo inflamatório causado por venenos botrópicos, já foi demonstrado a redução de edema tanto em músculo gastrocnêmio<sup>56</sup> quanto em pata<sup>57</sup> e diminuição do influxo leucocitário, no músculo gastrocnêmio após a injeção de miotoxinas BthTX-I e II<sup>58</sup> e no peritônio de animais injetados com o veneno de *B. jararacussu*<sup>1, 59</sup>. No entanto, poucos estudos demonstram o mecanismo de ação pelo qual o tratamento com a FBM diminui o efeito inflamatório causado pelos venenos botrópicos. Neste sentido, Franco et al (2016)<sup>60</sup> demonstrou que a irradiação, com laser de 660 nm e 780 nm causa diminuição da citocina IL-1 $\beta$  em células endoteliais que foram incubadas com o veneno de *B. jararaca*. Recentemente foi demonstrado que miotoxinas BthTX-I e II, isoladas do veneno de *B. jararacussu* causam a liberação do mediador inflamatório PGE<sub>2</sub>, importante mediador inflamatório, e o tratamento com o laser de baixa intensidade foi capaz de diminuir a liberação desse mediador<sup>50</sup>.

Em estudo recente, utilizando macrófagos murinos peritoneais, Pereira dos Reis et al., (2019)<sup>61</sup>, demonstrou que a fotobiomodulação com a LED terapia induziu diminuição nas espécies reativas de oxigênio e na liberação de nitrogênio e aumentou a capacidade fagocítica e na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos sob ação da miotoxinas BThtx I e II, isoladas do veneno de *B. jararacussu*, demonstrando a ação direta da fotobiomodulação em macrófagos.

Devido à relevância médica dos envenenamentos por serpentes do gênero Bothrops, a FBM pode ser uma terapia adicional a soroterapia para a redução dos efeitos locais causados pelo ofidismo minimizando sequelas e diminuindo custo e o tempo de internação do paciente.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto consiste em estudar o efeito da FBM em mecanismos inflamatórios, frente ao efeitos do VBjsu.

Objetivos específicos:

Avaliar o efeito da fotobiomodulação sobre macrófagos quanto:

- A viabilidade e mecanismo inflamatório
- A Liberação de mediadores inflamatórios
- Medição de cálcio intracelular

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado no laboratório de biotecnologia celular e molecular do curso de Mestrado e Doutorado em Medicina da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

#### **3.1. Desenho experimental**

A metodologia do projeto se inicia nos métodos de cultivo celular, que duravam até 3 dias, para que fosse possível fazer o plaqueamento das células RAW 264.7, para divisão dos grupos estudados e protocolos de cada ensaio realizado ao decorrer do estudo (Fig.3)

Os seguintes grupos foram estudados: (1) Controle (macrófagos que não receberam qualquer tratamento), (2) Controle+FBM (macrófagos que receberam irradiação uma vez com LBI), (3) Veneno (macrófagos que receberam veneno), (4) Veneno + FBM (macrófagos que receberam veneno e irradiação uma vez com LBI). Todos os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados em triplicatas, totalizando um N de nove para cada grupo analisado.

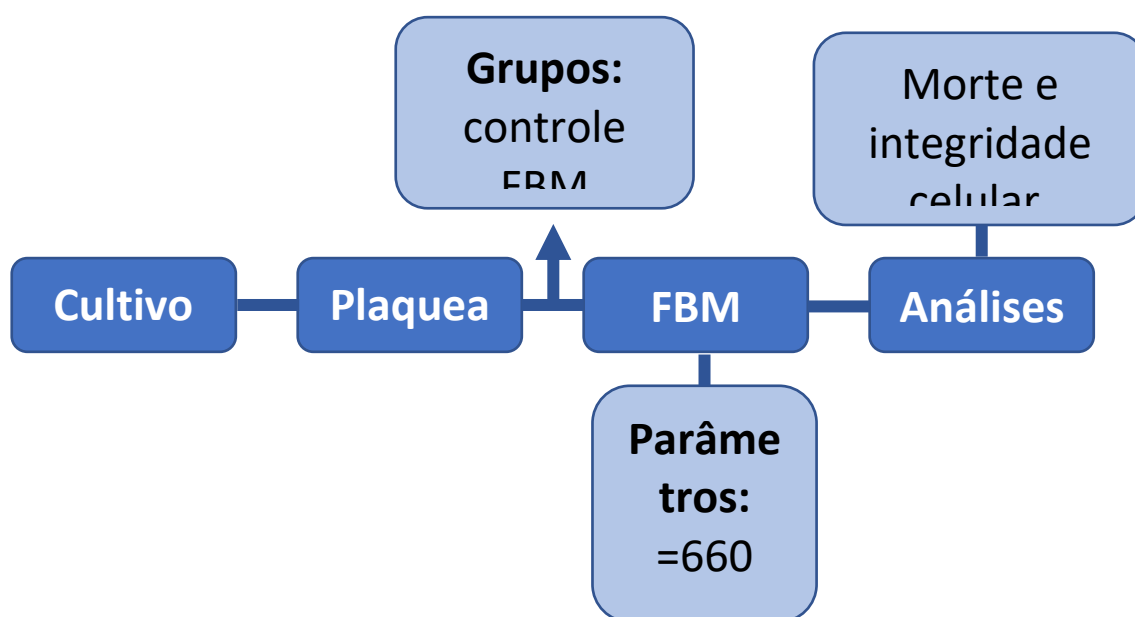


Figura 3. Fluxograma do desenho experimental do trabalho

### 3.2. Preparação do veneno

Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes *B. jararacussu* (VBjsu), provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba, fornecidos pelo prof. Dr. José Carlos Cogo. Os venenos dos exemplares foram reunidos em um mesmo tubo, homogeneizados, submetidos à liofilização e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

### 3.3. Macrófagos RAW 264.7



As células, provenientes da linhagem de macrófagos RAW 264.7, foram escolhidas para o trabalho, devido à sua utilização constante como célula alvo para avaliar a reatividade imunológica. As células foram gentilmente doadas pela Dra. Cristina Maria Fernandes, do Instituto Butantan e foram cultivadas no meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de glutamina e 1% de solução antibiótica-antimicótica de Penicilina Estreptomicina-Anfotericina.

### **3.4. Cultivo Celular**

Os macrófagos foram mantidos em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase. O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornou subconflente para a perpetuação da linhagem celular. Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS. Em seguida, foram adicionados 10 mL de PBS e as células foram raspadas com suporte plástico (Cell-Scraper). O PBS contendo as células foi transferido para um tubo falcoln e centrifugado a 1200 RPM durante 5 min. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%. A seguir, foram feitas diluições necessárias à semeadura das células, em placas de cultura.

### **3.5. Preparação de monocamadas de macrófagos para ensaios com o veneno**

A partir das culturas celulares obtidas como descrito no item 4.3, foram feitas as diluições necessárias para a semeadura das células. Assim, 1x10<sup>4</sup> célula/poço na passagem 7 das células, foram semeadas em placas de 96 poços, e colocadas em estufa numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 h. Após esse período as células foram incubadas com o veneno, diluídos em meio RPMI, no volume total de 50 µg/mL.

### **3.6. Métodos colorimétricos para determinação de viabilidade celular**

A viabilidade celular foi obtida pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo - Sigma, M2128) e cristal violeta (Sigma,

HT90-1), que se resume em uma análise colorimétrica que de forma indireta mede a citotoxicidade<sup>62</sup>. O corante cristal violeta também é aplicado para determinar a viabilidade celular por possuir a habilidade de ligação ao DNA.

### **3.6.1. MTT**

No ensaio de MTT, a citotoxicidade celular é avaliada através da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado. Após a solubilização com DMSO (dimetil-sufóxido), obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 4.3,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 h, as células foram tratadas com veneno de *B. jararacussu*, nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$ ; com tempo de 6 h. Após o término do tempo de tratamento, os poços foram lavados com 100  $\mu\text{L}$  de PBS e logo após adicionou-se MTT (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide - SIGMA M5655) em volume de 50  $\mu\text{L}$  (0,5mg/mL), procedendo-se então o incubamento das placas na estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de 4 h. Todo o líquido presente nas placas foi retirado, e adicionou-se então 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol, permitindo a quebra dos cristais de formazan. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se leitor de absorbância (540nm)

### **3.6.2. Cristal violeta**

Para efetuar a coloração com cristal violeta em placas de 96 poços, inicialmente o meio de cultura foi desprezado e 50  $\mu\text{L}$  da solução de coloração de cristal violeta (5% cristal violeta, 1,7% NaCl, 3,3% paraformaldeído em 33,3% etanol) foram adicionados aos poços e incubados na estufa a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, por um período 15 min. As placas foram lavadas por 2 min por imersão em água corrente, secas e posteriormente foi adicionado com 100  $\mu\text{L}$  de metanol, para a quebra dos cristais. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se um leitor de absorbância (540nm)

## **3.7. Fotobiomodulação com laser de baixa intensidade (LBI)**

O dispositivo laser utilizado foi o Laser da marca DMC® modelo Therapy XT e os parâmetros utilizados foram comprimento de onda de  $\lambda$  660 nm, potência de 100 mW (densidade de potência de  $0,33 \text{ W/cm}^2$ ), área do feixe de  $1 \text{ cm}^2$ , com densidade de energia de  $4 \text{ J/cm}^2$  e tempo de 40 s. As células foram irradiadas imediatamente após a adição do veneno na cultura, e foi aplicado de forma pontual diretamente no poço pela parte inferior da placa. Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa.

### **3.8. Dosagem de Citocinas**

Para verificar se VBjsu incubado com as células RAW 264.7, em diferentes tempos, libera citocinas pró- e anti-inflamatórias, foram realizadas respectivamente a dosagem das citocinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 pelo método ELISA (enzima imuno ensaio) no sobrenadante colhido destas células.

Os sobrenadantes foram coletados 1, 3, 6 e 24 h após a incubação com o VBjsu, em solução com meio de cultura, para a determinação das citocinas. Para essas coletas de sobrenadante, as células foram incubadas com o VBjsu e após 1h foi coletado o sobrenadante de cada grupo experimental armazenado em eppendorf, nos poços das células foi adicionado novo meio de cultura, sem veneno, para incubação e coleta do sobrenadante no período de 3 h, esse processo de coleta e incubação com meio de cultura foi realizado até a coleta do tempo de 24 h.

O sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo de captura (anti- IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10) marca Abcam, diluídos em PBS, e incubadas por 2 h, a  $37^\circ\text{C}$ . Após esse período, os sítios livres foram bloqueados com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio, contendo gelatina 3% em PBS e as placas foram incubadas por 18 h, a  $4^\circ\text{C}$ . Após lavagem da placa com PBS/Tween 20 0,05%, 50  $\mu\text{L}$  de amostras ou padrões (recombinantes) foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 2 h, a  $37^\circ\text{C}$ . A placa foi lavada com de PBS/Tween20 0,05% e a ligação aos anticorpos foi detectada pela adição do anticorpo de captura, diluído em PBS-gelatina 1% (5 $\mu\text{g/mL}$ , 50 $\mu\text{L/poço}$ ), seguido de incubação por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Após lavagem da placa foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de avidina-fosfatase alcalina, na diluição de 1:15000 em PBS-gelatina 1%, e incubados

por 30 min à temperatura ambiente, lavando-se em seguida. Para a revelação, foi utilizado o substrato cromógeno P-nitrofenil fosfato (200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), diluído em 1:5 em TRIS-HCl pH 9,8 1 M e 14 salina 0,5 M. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) a 450 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com o anticorpo recombinante para a determinação da concentração de cada citocina, representada em ng/mL.

### **3.9. Medição de cálcio intracelular**

As medições foram realizadas por métodos qualitativo e quantitativo. As células foram estimuladas por radicais de oxigênio (Molecular Probes Eugene, OR, EUA) um corante sensível ao cálcio Fluo-4, onde foi pipetado, 1 $\mu\text{L}$  da solução nas células mais uma concentração de 1 mmol/L com mais 0,005% de Pluronic F-127, pipetando um volume 1 $\mu\text{L}$  do reagente, que ficaram em contato durante 1 h em temperatura ambiente. Esse período de incubamento com corante foi monitorado em microscópio invertido de fluorescência e campos das células foram fotografados (Nikon, Eclipse TS100/ TS 100F), em comprimento de onda de excitação e emissão de 494nm e 516nm, respectivamente.

### **3.10. Análise Estatística**

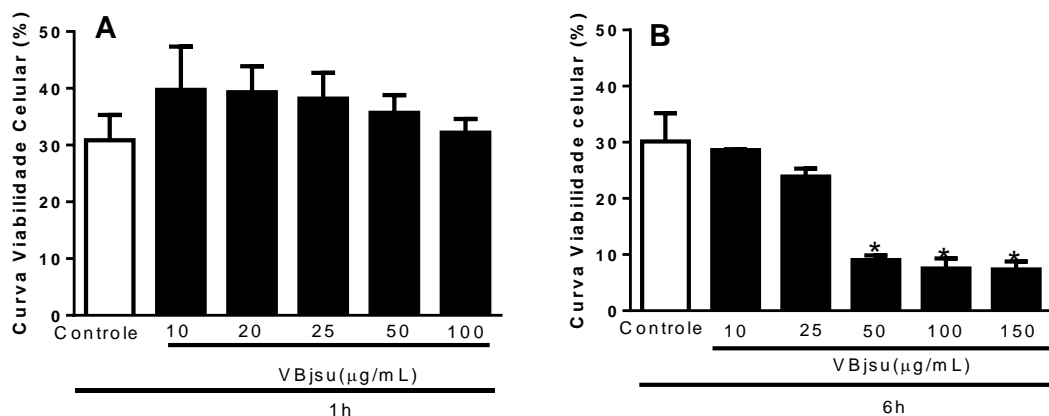
Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD). A análise estatística para comparação entre as médias dos grupos será realizada no programa Prism 6, por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Efeito do veneno de *B. jararacussu* (VBjsu) na viabilidade de macrófagos**

Para determinar a melhor concentração de veneno que causa diminuição da viabilidade celular, realizamos uma curva dose resposta. Os resultados não

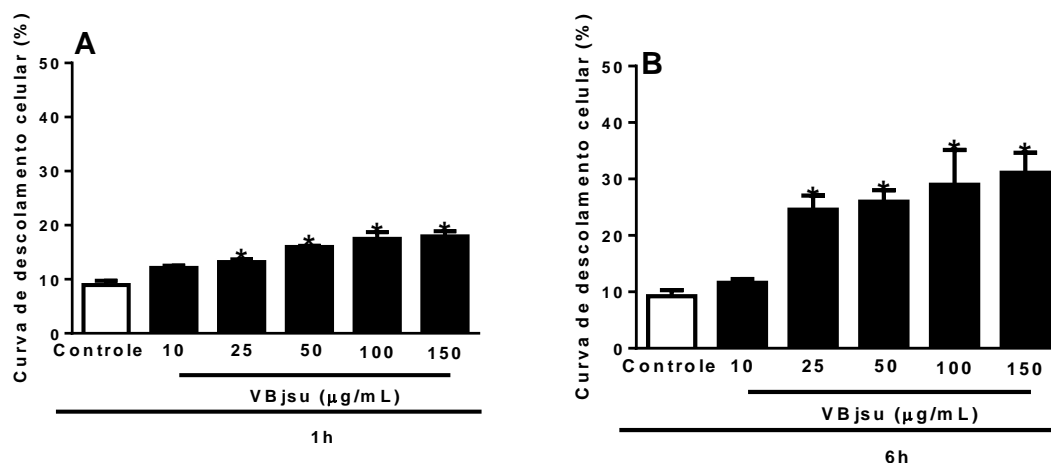
demonstram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas (10, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quando incubados por 1 h (Fig. 4A). No entanto, quando incubados os macrófagos por um período de 6 h com o VBjsu os resultados demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular nas concentrações de 50, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , quando comparada ao grupo controle, (Fig. 4B).



**Figura 4. Efeito do veneno *B. jararacussu* na viabilidade de macrófagos:** Células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período o veneno foi adicionado nas concentrações de 10, 20, 25, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubadas por 1 h ou concentrações de 10, 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou somente meio de cultura (controle) incubadas por 6 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, Anova \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 4.2 Efeito do veneno *B. jararacussu* (VBjsu) na integridade (descolamento) de monocamadas de macrófagos.

Os resultados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa no descolamento celular em quase todas as concentrações testadas (25, 50, 100 e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos períodos de 1h e 6h e nos tempos analisados (Fig.5 A e B).

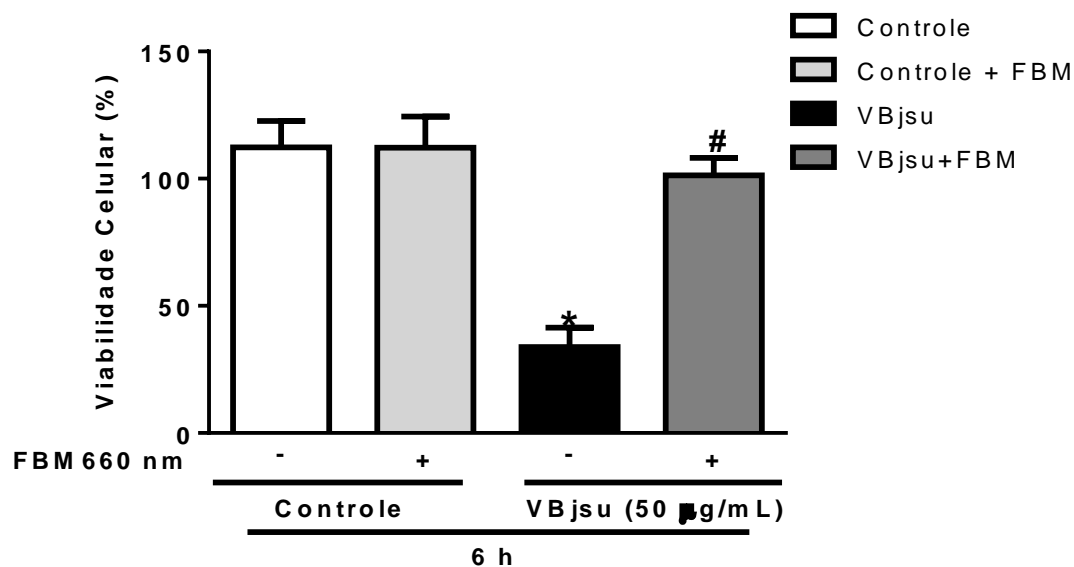


**Figura 5. Efeito do veneno *B. jararacussu* na integridade (descolamento) de monocamadas de macrófago.** Células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período o veneno foi adicionado nas concentrações de 10, 20, 25, 50 e 100 µg/mL ou somente meio de cultura (controle) e incubadas por 1 h e concentrações de 50, 100 e 150 µg/mL ou somente meio de cultura (controle) e incubadas por 6 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de cristal violeta. Cada valor representa a média ± EPM de três experimentos independentes, Anova \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 4.3. Efeito da FBM sobre a viabilidade de macrófagos incubados com veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

Baseado nos experimentos anteriores, todos os ensaios a seguir foram realizados com a concentração de 50 µg/mL e no tempo de 6 h.

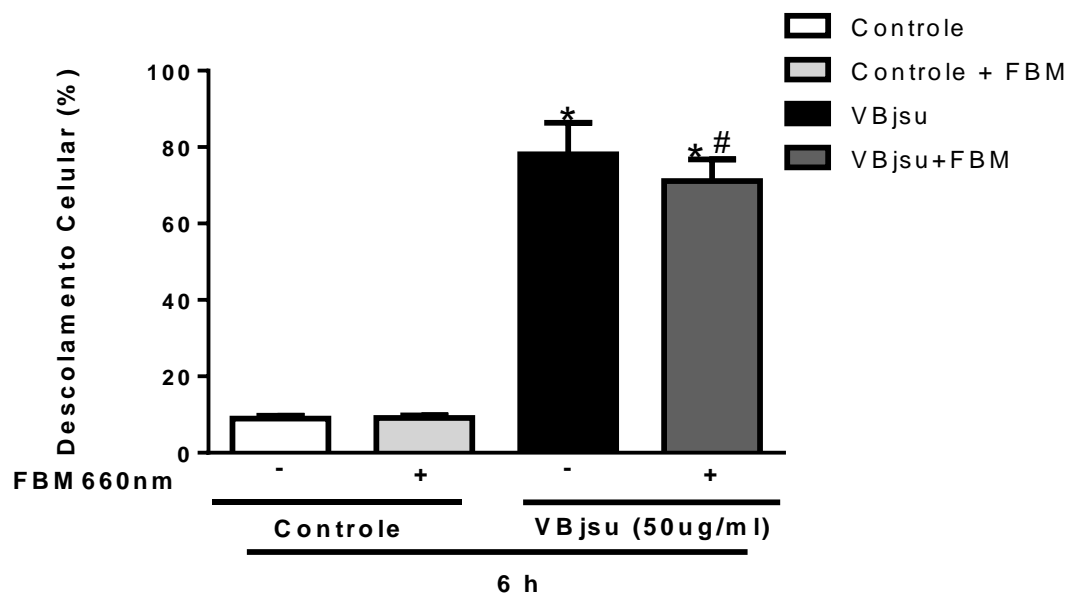
Os resultados demonstraram que o tratamento com a FBM não alterou a viabilidade de macrófagos incubados somente com o meio de cultura (Fig. 6). No entanto, o laser foi capaz de aumentar a viabilidade de macrófagos após a incubação com o veneno quando irradiados imediatamente com a FBM na densidade de energia (4J/cm<sup>2</sup>) usando comprimento de onda 660 nm (Fig. 6).



**Figura 6. Efeito da FBM sobre a viabilidade de macrófagos incubados com veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).** Células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período o veneno foi adicionado na concentração de 50 µg/mL ou somente meio de cultura (controle) e tratadas com FBM (660nm) e incubadas por 6 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Cada valor representa a média ± EPM de três experimentos independentes, \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0.05$  em relação ao grupo veneno.

#### 4.4. Efeito da FBM sobre a integridade de macrófagos incubados com veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

O efeito da FBM sobre a integridade de células Raw 264.7 foi analisado no tempo de 6 h após a adição do veneno na concentração de 50 µg/mL. Os resultados demonstraram que o veneno causou um aumento do descolamento celular. A FBM quando imediatamente irradiada nos macrófagos, na densidade de energia (4J/cm<sup>2</sup>) usando comprimento de onda 660 nm, foi capaz de proteger contra a ação do veneno (Fig. 7).



**Figura 7. Efeito da FBM sobre o descolamento celular de Células Raw 264.7 incubadas com veneno de *B. jararacussu*.** Células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período o veneno foi adicionado na concentração de 50 µg/mL ou somente meio de cultura (controle) e tratadas com FBM (660nm) e incubadas por 6 h. O descolamento celular foi determinado pelo método de cristal violeta. Cada valor representa a média ± EPM de três experimentos independentes, \* p<0.05 em relação ao grupo controle, # p<0.05 em relação ao grupo veneno.

#### 4.5. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-6 por macrófagos, induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

As concentrações de IL-6 foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 no período de 1, 3, 6 e 24 h após a incubação com o VBjsu (50 µg/mL) ou meio de cultura (controle). O VBjsu foi capaz de induzir a liberação de IL-6, pelos macrófagos, que foi significativamente diferente do controle em todos os tempos analisados, sendo que a maior liberação dessa citocina ocorreu às 3 h após a incubação do VBjsu (Fig.8). A FBM foi capaz de reduzir a liberação dessa citocina no período de 3 e 6 h da incubação com o veneno(Fig.



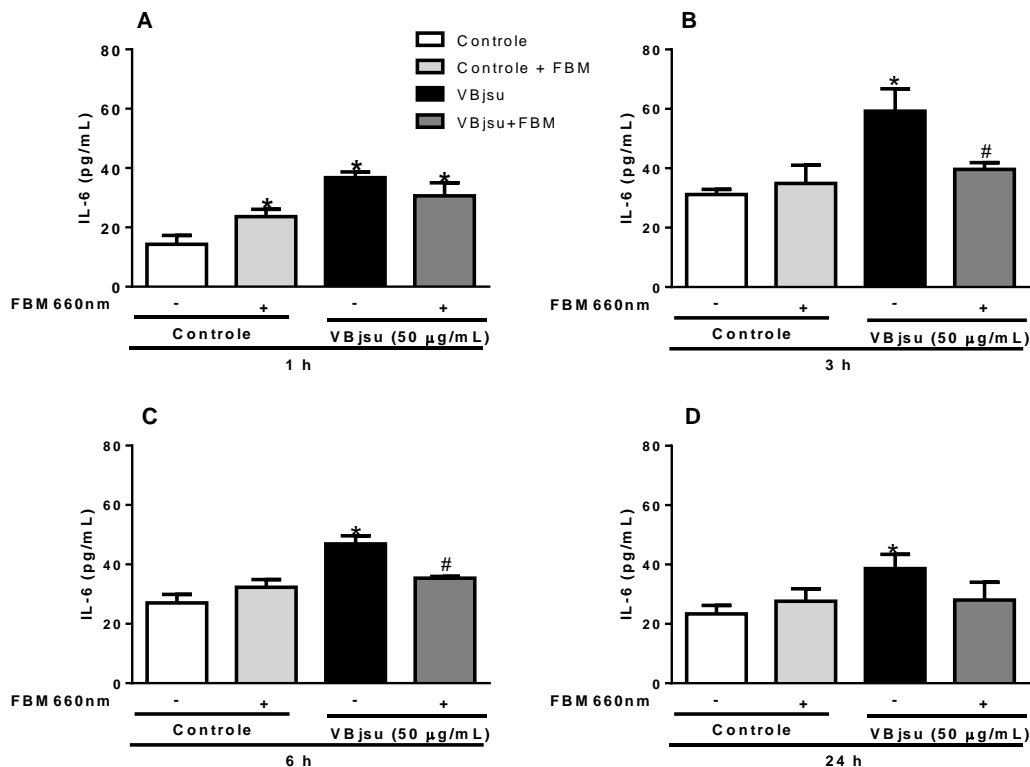
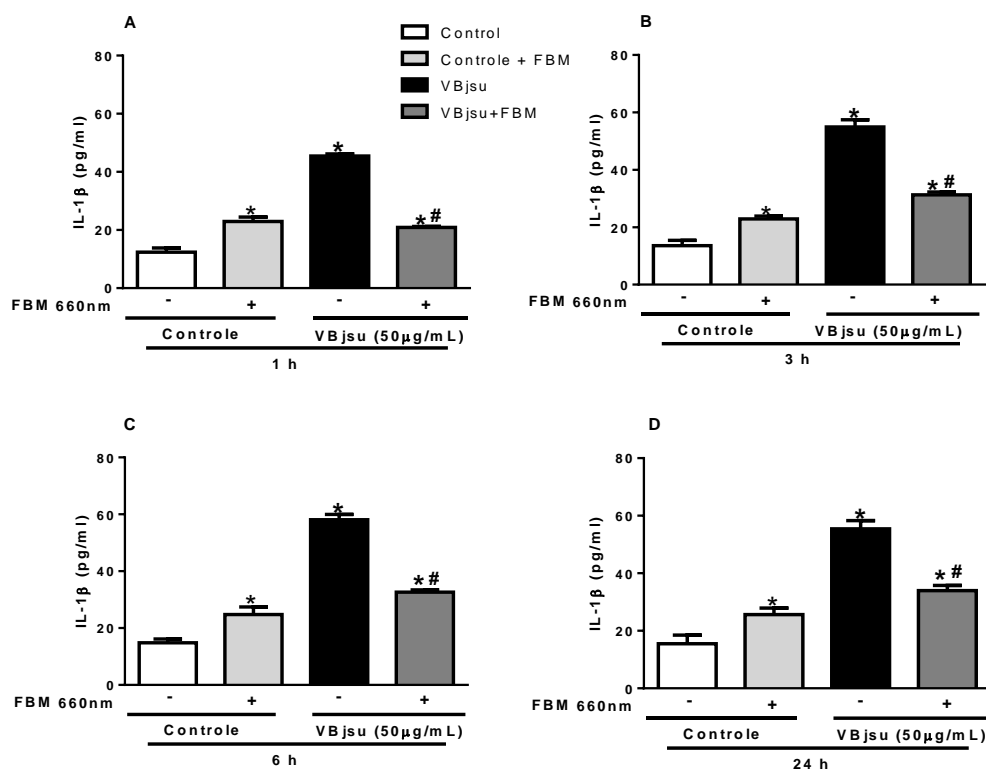


Figura 8. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-6 por macrófagos. As células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h para adesão celular. Após esse período, o VBjsu (50 µg/mL) foi adicionado à cultura celular e imediatamente FBM (660nm) e incubados por 1, 3, 6 e 24 h. As concentrações de IL-6 foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das células. \* p <0,05 vs. grupo controle; #p <0,05 vs. grupo veneno (ANOVA)

#### 4.6. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-1β por macrófagos, induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

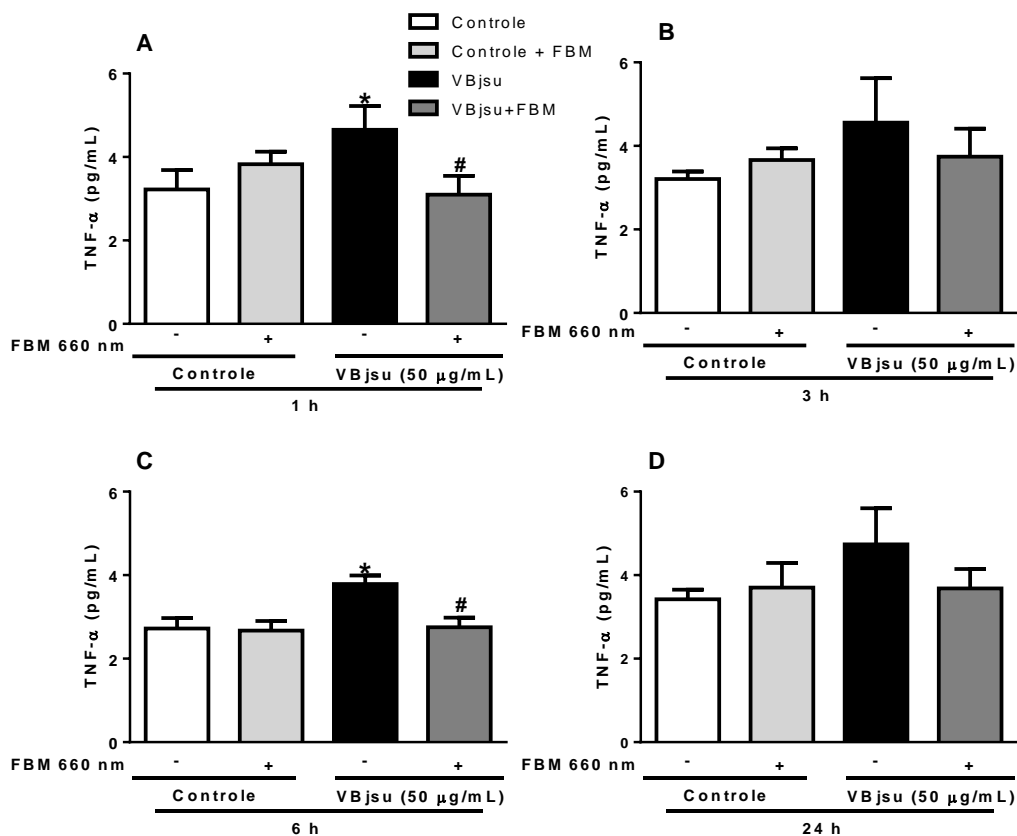
As concentrações de IL-1β foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 no período de 1, 3, 6 e 24 h após a incubação com o VBjsu (50 µg/mL) ou meio de cultura (controle). O VBjsu foi capaz de induzir a liberação de IL-1β, pelos macrófagos, que foi significativamente diferente do controle em todos os tempos analisados, sendo que a maior liberação dessa citocina ocorreu às 6 h após a incubação do VBjsu (Fig.9). A FBM foi capaz de reduzir a liberação dessa citocina em todos períodos de incubação com o veneno (Fig. 9 A, B, C e D).



**Figura 9. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-1β por macrófagos.** As células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu, 50 μg/mL) foi adicionado à cultura celular e imediatamente FBM (660nm) e incubados por 1, 3, 6 e 24 h. As concentrações de IL-1β foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das células. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo veneno (ANOVA)

#### 4.7. Efeito da FBM sobre a liberação de TNF-α por macrófagos, induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

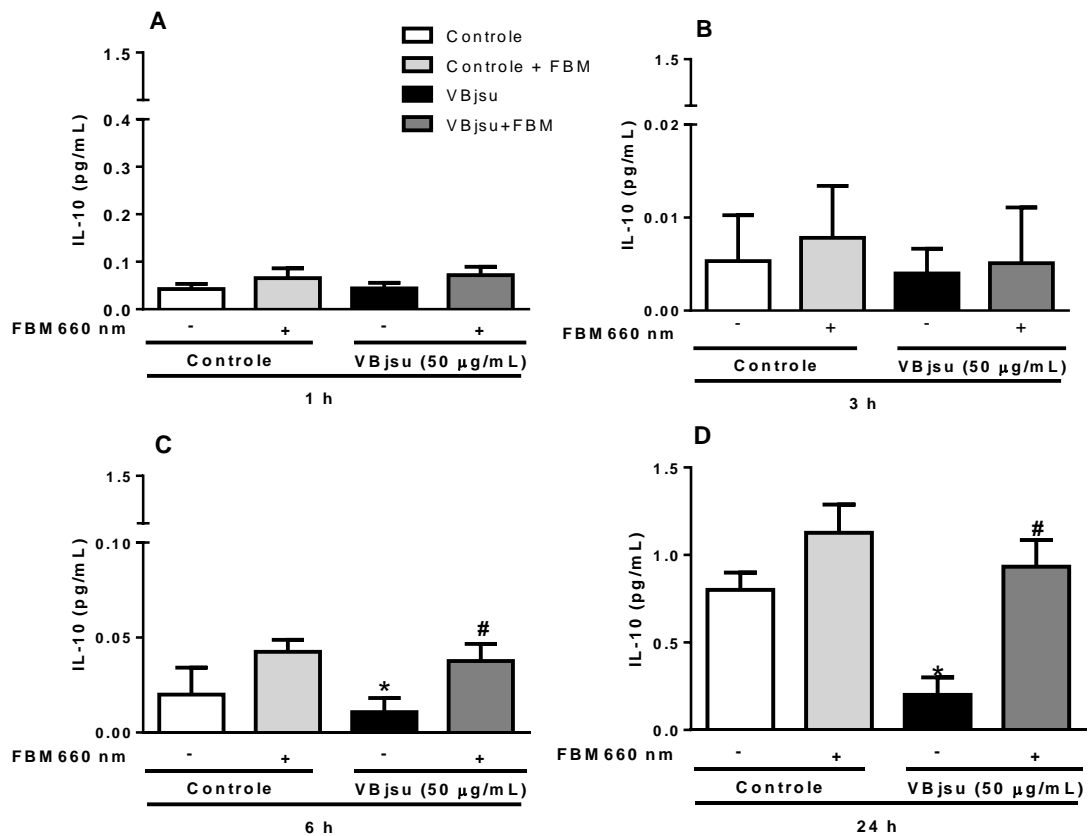
As concentrações de TNF-α foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 no período de 1, 3, 6 e 24 h após a incubação com o VBjsu (50 μg/mL) ou meio de cultura (controle). O VBjsu foi capaz de induzir a liberação de TNF-α, pelos macrófagos, que foi significativamente diferente do controle nos tempos de 1 e 6 h (Fig. 10). A FBM causou uma diminuição significativa dos níveis de TNF-α nos tempos de 1 e 6 h após a incubação com o veneno. (Fig 10 A e D.)



**Figura 10. Efeito da FBM sobre a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos.** As células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu, 50  $\mu$ g/mL) foi adicionado à cultura celular e imediatamente FBM (660nm) e incubados por 1, 3, 6 e 24 h. As concentrações de TNF- $\alpha$  foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das células. \*  $p < 0,05$  vs. grupo controle; #  $p < 0,05$  vs. grupo veneno (ANOVA)

#### 4.8. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-10 por macrófagos, induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

As concentrações de IL-10 foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células Raw 264.7 no período de 1, 3, 6 e 24 h após a incubação com o VBjsu (50  $\mu$ g/mL) ou meio de cultura (controle). O VBjsu foi capaz de induzir a liberação de IL-10, pelos macrófagos, que foi significativamente diferente do controle no tempo de 6 e 24 h (Fig.11). A FBM causou aumento significativo dos níveis de IL-10 no tempo de 6 e 24 h após a incubação com o veneno (Fig. 11 C e D).

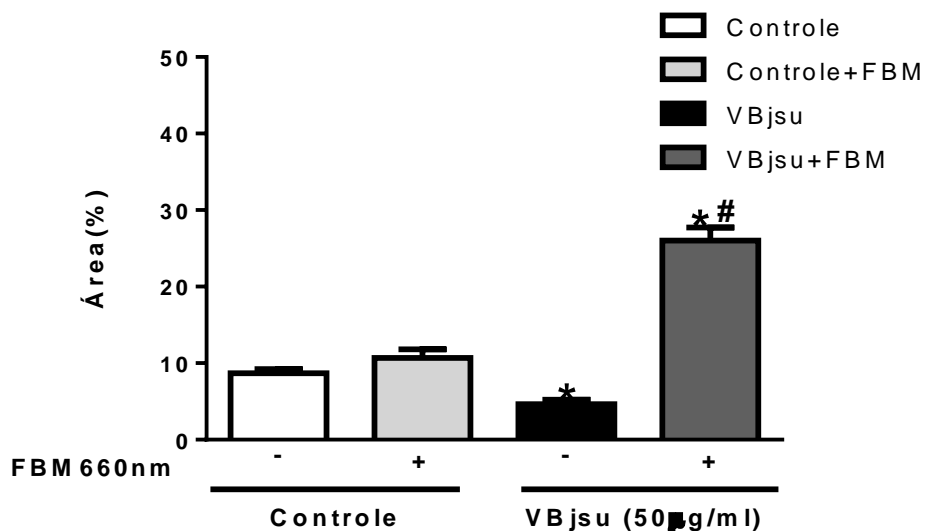


**Figura 11. Efeito da FBM sobre a liberação de IL-10 por macrófagos.** As células Raw 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado à cultura celular e imediatamente tratado por FBM (660nm) e incubados por 1, 3, 6 e 24 h. As concentrações de IL-10 foram avaliadas por ELISA no sobrenadante das células. \*  $p < 0,05$  vs. grupo controle; #  $p < 0,05$  vs. grupo veneno (ANOVA).

#### 4.9. Efeito da FBM na concentração de cálcio intracelular causada pelo do veneno da serpente *B. jararacussu*.

A mensuração de Fluo-4 revelou que a concentração de cálcio intracelular está diminuída no grupo veneno em relação ao grupo controle em 50 % (fig. 12 A e B). A FBM causou uma elevação significativa de cálcio intracelular comparação ao controle e ao grupo VBjsu (fig. 12 A e B).





**Figura 12. Efeito da FBM na concentração de cálcio intracelular de macrófagos RAW 264.7 causada pelo veneno *B. jararacussu*.** Células RAW 264.7 foram incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu, 50 µg/mL) foi adicionado à cultura celular e imediatamente irradiado com FBM. Em (A), as concentrações intracelulares de cálcio, foram avaliadas pela medição do fluxo de oxigênio sensível a cálcio-4 (verde) nas células RAW 264.7 controle, incubadas com veneno de *B. jararacussu* (50 µg/mL) e com tratamento de FBM 660nm analisado. Em (B), gráfico que mostra a intensidade de fluorescência de cálcio nas células RAW 264.7. Cada valor representa a média ± EPM de três experimentos independentes, \* p<0.05 em relação ao grupo controle, # p<0.05 em relação ao grupo veneno.

## 5. DISCUSSÃO

As ocorrências patológicas que estão associadas aos acidentes ofídicos são complexas e variáveis, de acordo com local e quantidade de veneno injetado e, primordialmente pela composição do veneno<sup>4</sup>. Devido a essas ocorrências, cada vez mais novas pesquisas são realizadas para compreender os mecanismos fisiológicos da ação do veneno, para desenvolvimento de novos tratamentos associativos a soroterapia. A inflamação é uma característica local importante do envenenamento por serpentes *Bothrops*, além disso, sabe-se que macrófagos são responsáveis por desempenhar funções diversas no processo inflamatório<sup>63</sup>. Na inflamação ocasionada por veneno de serpentes *Bothrops*, existem relatos demonstrando que venenos e suas toxinas isoladas são capazes de ativar funções de macrófagos, como fagocitose, produção de oxigênio reativo, citocinas e eicosanóides<sup>63</sup>. No presente estudo, avaliamos o efeito do veneno da serpente *B.*

*jararacussu* em macrófagos. Para isso, utilizamos a linhagem de macrófagos RAW 264.7.

Nos resultados desse trabalho, demonstramos que o veneno da *B.jararacussu* pode ocasionar a morte celular em macrófagos, e que dependendo da dose e tempo de exposição ao veneno ocorre uma leve proliferação celular, que chama atenção mesmo não apresentando diferença significativa. Esses resultados foram mostrados pelo ensaio de MTT, que verifica a capacidade metabólica das células, e corroboram com dados de outros dois estudos semelhantes utilizando veneno botrópico em macrófagos, onde em um período menor que 12 h em baixas dosagens de veneno ocorreram proliferação celular, e em altas dosagens (50, 100 µg/mL) por períodos prolongados ocorre ação citotóxica do veneno em macrófagos<sup>64, 65</sup>. Podemos observar também alteração na monocamada em concentrações mais altas, ocasionando o descolamento celular, confirmando a citotoxicidade do veneno do *B.jararacussu* em macrófagos. O descolamento celular já foi demonstrado em estudo com células endoteliais sob ação do veneno de *B.jararaca*<sup>60</sup>.

A fotobiomodulação possui a capacidade de alterar o fenótipo de células da linhagem de macrófagos, que são células de extrema importância no processo de reparo tecidual<sup>55</sup>. A FBM é indicada pela literatura como alternativa de tratamento de acidentes ofídicos, devido sua ação que capacita que ocorra a diminuição de hemorragia, mionecrose, hiperalgesia e quadro inflamatório no geral<sup>66, 67</sup>, e além de ser um tratamento não invasivo, possui baixo custo de tratamento. Os resultados obtidos em nossos estudos mostram que macrófagos que foram tratados com FBM (660 nm), diminuiu a morte celular no período de 6 h, mostrando a diminuição da citotoxicidade nas células, essa análise corrobora com os estudos de Pereira dos Reis V. et AL (2019)<sup>61</sup>, que demonstram que o tratamento com LED, aumentam a viabilidade celular em macrófagos peritoneais sob ação do veneno de *B.jararacussu*.

Neste estudo avaliamos o efeito da FBM sobre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias por células RAW 264.7 após a incubação com o veneno. Avaliamos a liberação das citocinas IL-6, IL-1β, TNF-α e IL-10 em sobrenadante de células RAW 264.7 incubadas nos períodos de 1, 3, 6 e 24h com o veneno na concentração 50 µg/mL e imediatamente irradiadas pelo LBI (λ660nm).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, relacionada à fase aguda de uma reação inflamatória, secretada por diversas células como macrófagos, eosinófilos e monócitos<sup>68</sup>. Ela pode induzir leucocitose, febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda<sup>69</sup>. Essa interleucina, após uma lesão, pode ser detectada após 1 h e possui um pico de liberação entre 4 e 6 h<sup>68</sup>. Nas análises de IL-6, verificamos um aumento da sua liberação no grupo incubado com o veneno de *B. jararacussu* em todos os tempos estudados. Outros estudos já demonstraram que o veneno botrópico induz a liberação de IL-6<sup>66, 70</sup>. A FBM gerou diminuição significativa desse mediador inflamatório, em 3 e 6 h, período em que houve maior liberação deste mediador pelo veneno. Esse resultado está em conformidade com outro trabalho, em modelo animal, que demonstrou um aumento de liberação de IL-6 após exposição ao veneno botrópico e que a FBM promoveu diminuição na liberação desse mediador inflamatório<sup>71</sup>.

A IL-1 $\beta$ , é uma das formas moleculares da IL-1, é produzida principalmente por macrófagos e monócitos, e tem caráter pró-inflamatório, que irá produzir uma inflamação sistêmica, ocasionando quadros febris<sup>68, 72</sup>. Nas nossas análises de IL-1 $\beta$ , foi verificado o aumento da sua liberação nas células incubadas com o veneno de *B. jararacussu* em todos os tempos analisados. No nosso estudo, conferimos que a FBM, gerou diminuição dessa citocina. Estudos mostram que essa citocina pró-inflamatória está aumentada em modelo animal após exposição ao veneno botrópico<sup>71</sup>. E em células C2C12, o IL-1 $\beta$  aparece aumentado ao estímulo do veneno de *B. jararacussu* e ao receber FBM, ocorre uma queda significativa em seus níveis<sup>66</sup>.

O TNF- $\alpha$  possui ações biológicas que incluem um nível abrangente de efeitos, que envolvem desde células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, até células como os adipócitos e células de tecido muscular. Na inflamação, o TNF- $\alpha$  está relacionado com processos agudos e crônicos, onde se destaca a ativação de neutrófilos, com consequente desgranulação, aumento de citotoxicidade para certos patógenos e aumento de atividade fagocítica<sup>73</sup>. A liberação de TNF- $\alpha$ , só foi significativa em dois tempos analisados (1 e 6 h), onde ao ser estimulado com veneno, os níveis dessa citocina foram aumentados, no modelo experimental com células RAW 264.7. Almeida MT et al (2020)<sup>74</sup>, avaliaram a presença de TNF- $\alpha$  após a injeção de veneno do *B. atrox*, em camundongos, e

observaram que a liberação de TNF- $\alpha$  induzido por veneno atingiu uma alta liberação entre 2 e 6 h.

A IL-10, no nosso modelo experimental, começou a apresentar diferença significativa, apenas nos períodos de 6 e 24 h, sendo que nas primeiras horas sua liberação foram bem pequenas, e no período de 24 h a sua liberação foi bem expressiva, o que era esperado, uma vez que essa citocina está associada ao final do processo inflamatório, sendo caracterizada uma citocina reguladora, uma vez que ela possui a capacidade de inibir a ação pró-inflamatórias de citocinas<sup>75</sup>. A FBM foi capaz de aumentar significativamente a liberação dessa citocina, também nos períodos de 6 e 24h, corroborando com estudo de Nadur- Andrade et al (2016)<sup>71</sup> no qual a FBM (660nm), também aumentou o nível desse mediador anti-inflamatório no período de 6 h.

Assim, em relação ao efeito FBM no processo inflamatório, nossos resultados mostraram que a laser terapia tem um efeito anti-inflamatório em macrófagos, reduzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e aumentando o mediador anti-inflamatório. De acordo com nossos resultados, estudos anteriores também descobriram que a FBM diminuiu os níveis de vários marcadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em células sob ação de venenos botrópicos<sup>71, 60</sup>. Portanto, a modulação dos mediadores inflamatórios pela FBM pode ser um dos fatores relacionados à diminuição do quadro inflamatório, como redução de edema, migração leucocitária e hiperalgesia observada em experimentos *in vivo*.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram um aumento significativo de cálcio intracelular em macrófagos que foram irradiadas. A literatura mostra que a FBM, em diferentes comprimentos de onda, pode afetar a captação de Ca<sup>2+</sup> em vários modelos<sup>76</sup>. Neste sentido, Young et al. (1990),<sup>77</sup> usando o LBI no comprimento de onda de 660 nm, mostraram que a terapia de luz pode estimular o influxo do íon Ca<sup>2+</sup> na célula U937. Ainda, o efeito do LBI He-Ne de 632,8 nm causou aumento da concentração intracelular de cálcio em linfócitos humanos e neurônios de rato, *in vitro*<sup>78</sup>. Lan et al. (30)<sup>79</sup> mostraram que um dos primeiros eventos induzidos pelo laser He – Ne 632, 28 nm envolve atividades imediatas de aumento do citocromo c oxidase e níveis intracelulares elevados de Ca<sup>2+</sup>. Wang et al. (2014)<sup>80</sup> mostraram que a irradiação a laser na faixa visível e no infravermelho, pode modular a função e a expressão dos canais iônicos. Como canais de íons



permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sua ativação pode contribuir para o aumento induzido por laser no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que desencadeia a degranulação e a liberação endocitótica de ATP <sup>78</sup>. Neste sentido, em trabalho anterior de nosso grupo demonstramos que a FBM aumenta a concentração de ATP intracelular <sup>60</sup>.

## **Conclusão**

Considerando as análises realizadas em cultura de macrófagos, com os parâmetros do laser utilizados, podemos concluir que a PBM possui efeito benéfico sobre os macrófagos em resposta ao VBjsu, conferindo suporte para serem realizados novos estudos, uma vez que foi observado:

- ✓ Aumento na viabilidade celular;
- ✓ Aumento da integridade celular;
- ✓ Diminuição de mediadores inflamatórios, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e aumento do mediador antiinflamatório IL-10;
- ✓ Aumento da concentração de Cálcio intracelular.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Sousa EA, Bittencourt JAHM, de Oliveira NKS, Henriques SVC, Picanço LCS, Lobato CP, Ribeiro JR, Pereira W LA, Carvalho JCT, da Silva JO. Effects of a Low-level Semiconductor Gallium Arsenide Laser on Local Pathological Alterations Induced by Bothrops moojeni Snake Venom. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013; 12:1895–1902.
2. Barraviera B. Estudo Clínico dos Acidentes Ofídicos: Revisão. JBM, São Paulo, 1993; 65(4):209-250. Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes por Animais Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1999.
3. Giaretta VMA, Santos LP, Barbosa AM, Hyslop S, Corrado AL, Galhardo MS, Nicolau RA, Cogo JC. Low-intensity Laser Therapy Improves Tetanic Contractions in Mouse Anterior Tibialis Muscle Injected with Bothrops jararaca Snake Venom. *Res. Biomed. Eng.* 2016; 32(2): 153- 160.
4. Doin-Silva R, Baranauskas V, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Höfling MA. The Ability of Low Level Laser Therapy to Prevent Muscle Tissue Damage Induced by Snake Venom. *Photochem Photobiol*, 2009; 85(1):63- 9.
5. Zamuner SR, da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues- Simioni L. Comparison of the Neurotoxic and Myotoxic Effects of Brazilian Bothrops Venoms and their Neutralization by Commercial Antivenom. *Toxicon*, 2004; 44: 259–71.
6. Nadur-Andrade N, Zamuner SR, Toniolo EF, de Lima CJ, Cogo JC, Dale CS. Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on Bothrops moojeni Venom-Induced Hyperalgesia. *Photochemistry and Photobiology*, 2014; 90: 207–213.
7. Mourão VB, Giraldo GM, Neves LM, Gaspi FO, Rodrigues RA, Alves AA, Esquisatto MA, Mazzi MV, Mendonça FA, Santos GM. Anti- hemorrhagic Effect of Hydro-alcoholic Extract of the Leaves of Mikania Glomerata in Lesions Induced by Bothrops jararaca Venom in Rats. *Acta Cir Bras*, 2014; 29(1):30-7.
8. Dourado MD, Fávero S, Baranauskas V, da Cruz-Höflin MA. Effects of the Ga-As Laser Irradiation on Myonecrosis Caused by Bothrops Moojeni Snake Venom. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003; 33:352– 357
9. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Sousa L, Soares AM, Zamuner SF, Cogo JC, Zamuner SR. Low-level Laser Therapy Decreases Local Effects Induced by Myotoxins Isolated from Bothrops jararacussu Snake Venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 2010; vol 16, issue 3.
10. Brenes, F.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Immunohistochemical Demonstration of the Binding of Bothrops asper Myotoxin to Skeletal Muscle Sarcolemma. *Toxicon*, 1987; 25(5):574-7.
11. Milani Júnior R, Jorge MT, de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, Ribeiro LA, Fan HW, França FO, Sano-Martins IS, Cardoso D, Ide Fernandez C, Fernandes JC, Aldred VL, Sandoval MP, Puerto G, Theakston RD, Warrell DA. Snake Bites by the Jararacuçu (Bothrops jararacussu): Clinicopathological Studies of 29 Proven Cases in São Paulo State, Brazil. *QJM*, 1997; 90(5):323-34.
12. Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009; Vol 27, Number 4.

13. Campbell JÁ, Lamar WW. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, 2014; 2: 713p.
14. Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, DINIZ MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta, G; et al. Biological Activities of Venoms from South American snakes. *Toxicon*, 1992; 30(1):95-103.
15. Da Silva CRD, Borgomoni GB, Carvalho LMG, Perecini VS. Estudo Epidemiológico e Sorológico Ofídico do Gênero Bothrops, em Foco na Espécie Bothrops jararaca. *Revista unilus ensino e pesquisa*, 2016; vol 13.
16. Caproni P, Baptista JA, De Almeida TL, Passos LAC, Nascimento N. Study of irradiated bothropstoxin-1 with<sup>60</sup>Co gamma rays: immune system behavior. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 2009; v. 15 p. 216-225.
17. Medzhitov R. Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature*, 2008; vol.454.
18. Hamidzadeh K, Stephen M. Christensen, Elizabeth Dalby, Prabha Chandrasekaran, and David M. Mosser. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu Rev Physiol*, 2017; 10; 79: 567–592.
19. Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F. Inflammation induced by Bothrops asper venom. *Toxicon*, 2009; v. 54 p. 67–76.
20. Fujiwara N, Kazuo Kobayashi K. Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 2005; 4, 281-28.
21. Collins T. In Robbins *Pathologic Basis of Disease*, Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. Eds.; Saunders: Philadelphia, 1999, pp. 50-88.
22. King, TC. *Patologia*. 1ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007; pg.21.
23. Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Springer Science+Business Media New York*, 2016.
24. Serhan CN, Savill J. Resolution of Inflammation: the Beginning Programs the end. *Nat Immunol*, 2005.
25. Owen JL e Mohamadzadeh M. Macrophages and Chemokines as Mediators of Angiogenesis. *Front Physiol*, 2013; 4:159.
26. Tidball JG. Regulation of Muscle Growth and Regeneration by the Immune System. *Nat Rev Immunol*, 2017; 17: 165-178.
27. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, et al. Differentially Activated Macrophages Orchestrate the Fate of Myogenic Precursor Cells During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Células-tronco*, 2013; 31: 384-396.
28. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, Garcia MP, Nunes FD, Junior EMS, França CM, Bussadori SK, Fernandes KPS. Photobiomodulation and Different Macrophage Phenotypes During Muscle Tissue Repair. *J Cell Mol Med*, 2018; 22 (10): 4922-4934.
29. Zoccal KF, Ferreira GZ, Prado MKB, Gardinassi LG, Sampaio SV, Faccioli LH. LTB4 and PGE2 Modulate the Release of MIP-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by Cells Stimulated with Bothrops Snake Venoms. *Toxicon*, 2018; 150:289-296.
30. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, Kerr MWA, Santana MF, Martins-Filho OA, Lacerda MVG, Ferreira LCL, Malheiro A, Monteiro WM. An Immunological Stairway to Severe Tissue Complication Assembly in Bothrops atrox Snakebites. *Front Immunol*, 2019; 10: 1882.
31. Wanderley CW, Silva CM, Wong DV, Ximenes RM, Morelo DF, Cosker F, Aragão KS, Fernandes C, Palheta-Júnior RC, Havt A, Brito GA, Cunha FQ, Ribeiro RA, Lima-Júnior RC. Bothrops jararacussu Snake Venom-Induces a Local Inflammatory

Response in a Prostanoid- and Neutrophil-Dependent Manner. *Toxicon*, 2014; 90:134-47.

32. Zamuner, S. R., et al. Bothrops asper and Bothrops jararaca Snake Venoms Trigger Microbicidal Functions Peritoneal Leucocytes in vivo. *Toxicon*, 2001; vol. 39, n.10, p. 1505-1513.

33. Luchini LSG, Pidde G, Squaiella-Baptistão CC, Tambourgi DV. Corrigendum: Complement System Inhibition Modulates the Pro- Inflammatory Effects of a Snake Venom Metalloproteinase. *Front. Immunol*, 2019.

34. Chaves F, et al. Pharmacological Study of Edema Induced by Venom of the Snake Bothrops asper (Terciopelo) in Mice. *Toxicon*, 1995; vol. 33, n. 1, p. 31-39.

35. Battelino C, Piazza R, Silva AMG, Cury Y, Farsky HP. Assessment of Efficacy of Bothropic Antivenom Therapy on Microcirculatory Effects Induced by Bothrops jararaca Snake Venom. *Toxicon*, 2003; 41, 5:583-593.

36. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local Tissue Damage Induced by Bothrops Snake Venoms. *Mem. Inst. Butantan*, 1989; vol.5, p.211-223.

37. Silva PAR, Neves AC, Rocha CB, Silva AMM, Faquim-Mauro EL. Differential Macrophage Subsets in Muscle Damage Induced by a K49- PLA2 from Bothrops jararacussu Venom Modulate the Time Course of the Regeneration Process. *Inflammation*, 2019.

38. Menaldo DL, Bernardes CP, Zoccal KF, Jacob-Ferreira AL, Costa TR, Del Lama MP, Naal RM, Frantz FG, Faccioli LH, Sampaio SV. Immune Cells and Mediators Involved in the Inflammatory Responses Induced by a P-I Metalloprotease and a Phospholipase A2 from Bothrops atrox Venom. *Mol Immunol*, 2017; 85:238-247.

39. Qureshi R, Jakschik BA. The Role of Mast Cells in Thioglycollate-induced inflammation. *J. Immunol*, 1988; vol 141, p. 2090-2096.

40. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast Cells as Sentinels of Innate Immunity. *Curr. Opin. Immunol*, 1999; vol. 11, p. 53-59.

41. Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: an Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Front. Biosci*, 2004; vol 9, p. 283-289.

42. Landucci EC, Castro RC, Pereira MF, Cintra AC, Giglio JR, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G. Mast Cell Degranulation Induced by two Phospholipase A2 Homologues: Dissociation Between Enzymatic and Biological Activities. *Eur. J. Pharmacol*, 1998; vol. 343, p. 257-263.

43. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 Myotoxins from Bothrops Snake Venoms. *Toxicon*, 1995; 33: 1405-1424.

44. Da Silva JP, Da Silva MA, Almeida APF, Lombardi I, Matos AP. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomed Laser Surg*, 2010; 28(1):17-21.

45. Kitchen SS, Partridge CH. A Review of Low Level Laser Therapy Parts I: Background, Physiological Effects and Hazards. *Physiotherapy*, 1991; vol.77; p.161 – 163.

46. Tuner J, Hode L. Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background. Sweden: Prima Books, 2002.

47. Karu TI. Cellular and Molecular Photobiomodulation Mechanisms (Low Power Laser Therapy). *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2014; 20 (2), 143-148.

48. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*, 2016; 22(3).

49. Nadur-Andrade N, Barbosa NA, Carlos FP, Lima CJ, Cogo JC, Zamuner SR. Effects of Photobiostimulation on Edema and Hemorrhage Induced by Bothrops moojeni Venom. Springer-Verlag London Ltd, 2011.
50. Santos ASD, Guimarães-Sousa L, Costa MS, Zamuner LF, Sousa NC, Hyslop S, Soares AM, Chavantes MC, Cogo JC, Zamuner SR. Photobiomodulation of Local Alterations Induced by BthTX-I, a Phospholipase A2 Myotoxin from Bothrops jararacussu Snake Venom: In Vivo and in Vitro Evaluation, 2018; 107(Pt B):2020-2025.
51. Dourado DM, Fávero S, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. Effects of the Ga-As Laser Irradiation on Myonecrosis Caused by Bothrops Moojeni Snake Venom. Lasers in Surgery and Medicine, 2003; 33:352–357.
52. Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH. GaAs 904-nm Laser Irradiation Improves Myofiber Mass Recovery During Regeneration of Skeletal Muscle Previously Damaged by Crotoxin. Lasers Med Sci, 2012; 27:993–1000.
53. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of Action for Light Therapy: a Review of Molecular Interactions. Exp Biol Med, 2012; 237(11):12418.
54. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-Level Laser (Light) Therapy (LLLT) in Skin: Stimulating, Healing, Restoring. Semin Cutan Med Surg 2013; 32(1):41-52.
55. Hamblin MR. Mechanisms and Applications of the Anti-inflammatory Effects of Photobiomodulation. AIMS Biophys, 2017; 4(3): 337–361.
56. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães- Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of Low Level Laser in the Inflammatory Response Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom. Toxicon, 2008; 51(7):1236-44.
57. Nadur-Andrade N, Barbosa AM, Carlos FP, Lima CJ, Cogo JC, Zamuner SR. Effects of Photobiostimulation on Edema and Hemorrhage Induced by Bothrops moojeni Venom. Lasers Med Sci, 2012; 27:65–70.
58. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Sousa L, Soares AM, Zamuner SF, Cogo JC, Zamuner SR. Low-Level Laser Therapy Decreases Local Effects Induced by Myotoxins Isolated from Bothrops jararacussu Snake Venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 2010; vol.16.
59. Souza LG, Dale CS, Nadur-Andrade N, Barbosa AM, Cogo JC, Zamuner ST. Low-Level Laser Therapy Reduces Edema, Leukocyte Influx and Hyperalgesia Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom. Clin Exp Med Lett, 2011; 52(3-4): 97-102.
60. Franco ATB, Silva LMG, Costa MS, Zamuner SF, Vieira RP, De Fatima PTC, Zamuner, SR. Effect of Photobiomodulation on Endothelial Cell Exposed to Bothrops jararaca Venom. Lasers in Medical Science, 2016; vol. 31, p. 1017-1025.
61. Pereira dos Reis V, Tavares MNM, Rego CMA, Ferreira e Ferreira AA, da Silva Setubal S, Soares AM, Zamuner SR, Zuliani JP. Light emitting diode (LED) photobiomodulation therapy on murine macrophage exposed to Bothropstoxin-I and Bothropstoxin-II myotoxins. Toxicon. 2019, 172: 45-52.
62. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 1983, v. 65, n1/2, p. 55-63.
63. Echeverría S, Leiguez E, Guijas C, Nascimento NG, Acosta O, Teixeira C, Rodríguez JP. Evaluation of pro-inflammatory events induced by Bothrops alternatus snake venom. Chem Biol Interact, 2018.
64. de Menezes RRPPB, Mello CP, Lima DB, Tessarolo LD, Sampaio TL, Paes LCF, Alves NTQ, Junior EMA, Junior RCPL, Toyama MH, Martins AMC. Involvement of

Nitric Oxide on *Bothropoides insularis* Venom Biological Effects on Murine Macrophages In Vitro. PLoS One, 2016; 11(3): e0151029.

65. de Menezes RR, Torres AF, da Silva TS, de Sousa DF, Lima DB, Norjosa DB, Nogueira NA, Oliveira MF, de Oliveira MR, Monteiro HS, Martins AM. Antibacterial and Antiparasitic Effects of *Bothropoides lutzi* Venom. Nat Prod Commun, 2012 Jan; 7(1):71-4

66. Gouveia VA , Pisete FRFS , Wagner CLR , Dalboni MA , de Oliveira APL , Cogo JC , Zamuner SR . Photobiomodulation Reduces Cell Death and Cytokine Production in C2C12 Cells Exposed to Bothrops Venoms. Lasers Med Sci, 2019.

67. Silva LM , Silva CA , Silva Ad , Vieira RP , Mesquita-Ferrari RA , Cogo JC , Zamuner SR . Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. PLoS One, 2016.

68. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. Rev. Bras. Anestesiol, 2011, v.61.

69. Kishimoto TK. The biology of interleukin-6. Blood, 1989; 74:1-10.

70. Aranda-Souza MÂ , Lorena VMB , Correia EDMP , Pereira-Neves Um , Figueiredo RCBQ. A C-type Lectin from *Bothrops leucurus* Snake Venom Forms Amyloid-Like Aggregates in RPMI Medium and are Efficiently Phagocytosed by Peritoneal Macrophages. Toxicon, 2019.

71. Nadur-Andrade N , Dale CS , Oliveira VR , Toniolo EF, Feliciano RD, da Silva JA Jr , Zamuner SR . Analgesic Effect of Photobiomodulation on *Bothrops moojeni* Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. PLoS Negl Trop Dis, 2016.

72. Costa RD, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AMDD, Costa MD, Nishi MP, Teixeira MM , Teixeira AL, de Figueiredo Antunes CM. Evaluation of the Expression of Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL-1Ra) in Leprosy Patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2008.

73. Keblanoff SJ, Vadas MR, Harlan, JM. Stimulation of Neutrophil by Tumor Necrosis Factor. J.Immunol, 1986, 136:4220.

74. de Almeida MT ,Freitas-de-Sousa LA, Colombini M, Gimenes SNC , Kitano ES, Faquim-Mauro EL, Serrano SMT, Moura-da-Silva AM. Inflammatory Reaction Induced by Two Metalloproteinases Isolated from *Bothrops atrox* Venom and by Fragments Generated from the Hydrolysis of Basement Membrane Components. Toxins, 2020.

75. Moore KW, O'Garra A, Waal Malefyt R. , Vieira P , Mosmann TR . Interleukin-10. Annu Rev Immunol, 1993.

76. Amaroli A, Ferrando S, Benedicenti S. Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. Photochem Photobiol. 2019 Jan;95(1):455-459.

77. Young S, Dyson RM, and Bolton P. Effect of light on Calcium Uptake by Macrophages. Laser Ther, 1990; 2, 53-57.

78. Yanmei T, Juan W, Yu W, Zuxuan ZH, Jinxi J, Zhengrong H. Effects of low level laser irradiation on intracellular free calcium concentration and SOD activity in vitro and in vivo study. Appl Laser 1997; 17:89–93.

79. Lan CC, Wu, SB, Wu CS, Shen YC, Chiang TY, Wei YH, Yu HS. Induction of primitive pigment cell differentiation by visible light (helium- neon laser): a photoacceptor-specific response not replicable by UVB irradiation. J Mol Med (Berl). 2012; 90, 321-30.

80. Wang L, Zhang D and Schwarz W. TRPV channels in mast cells as a target for low-level-laser therapy. *Cells*. 2014; 3, 662–673