



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

LUCIANA MIATO GONÇALVES SILVA

**Efeito da fotobioestimulação sobre células musculares C2C12
submetidas à ação do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*:
mecanismos de reparo celular**

São Paulo
2020



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Efeito da fotobioestimulação sobre células musculares C2C12 submetidas à ação do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*: mecanismos de reparo celular

Effect of photobiostimulation on C2C12 muscle cells in response to the action of Bothrops jararacussu snake venom: mechanisms of cellular repair

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de pós-graduação em Medicina.

Orientadora: Dra. Stella Regina Zamuner

São Paulo
2020

Silva, Luciana Miato Gonçalves.

Efeito da fotobioestimulação sobre células musculares C2C12 submetidas à ação do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*: mecanismos de reparo celular. / Luciana Miato Gonçalves Silva. 2020.

64 f.

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

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

B. jararacussu. 2. Mionecrose. 3. Mioblastos. 4. Viabilidade. 5. Laser de baixa intensidade
Zamuner, Stella Regina. II. Título.

CDU 616



São Paulo 20 de fevereiro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **LUCIANA MIATO GONÇALVES SILVA**

Titulo da Tese: **EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE MIOBLASTOS C2C12 SUBMETIDOS A AÇÃO DO VENENO DA BOTHROPS JARARACUSSU: MECANISMO DE REPARO CELULAR.**

Presidente: **PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER**

Membro: **PROF. DR. HUMBERTO DELLÈ**

Membro: **PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS**

Membro: **PROFA. DRA. CAMILA SQUARZONI DALE**

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente ao Senhor meu Deus, a quem me capacitou para essa jornada, ao meu amado Esposo Petrônio, quem acreditou em mim e me deu muito apoio, até chegar aqui.

Dedico às minhas amadas professoras Silvia e Stella Zamuner, por todos os ensinamentos, tempo dedicado, por sempre serem tão compreensivas, por me permitir fazer parte de suas vidas, e pela amizade construída por esses longos anos juntas, e para que eu chegasse até aqui, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal.

Dedico a todos que fizeram parte dessa jornada, todos os amigos conquistados, por todas as minhas alunas de iniciação científica, e todos os imprevistos que nos fizeram crescer e poder dar vida a esse trabalho.

Dedico esse trabalho a todos os meus professores ao longo da minha vida acadêmica, pois sem a paciência e dedicação deles, eu não estaria aqui.

**Porque para Deus nada será impossível.
Luca 1:37**

Agradecimentos

O presente trabalho que só pode ser realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (**CAPES**)

Agradeço à universidade Nove de Julho pela oportunidade de poder ter realizado esse curso, e fazer adicionar todas as experiências acadêmicas e pessoais em minha vida, de ter ampliado excepcionalmente minha vida acadêmica e todo meu conhecimento.

Agradeço às universidades UNIFESP- (SP) e USP – (SP), por toda a colaboração no meu projeto, para a sua finalização, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro, assim me possibilitando minha dedicação exclusiva à finalização de meu Doutorado.

Agradeço a todos os professores da Uninove, que sempre me foram solícitos e gentis e sempre prestativos em me auxiliarem, a todos os funcionários da instituição que sempre estavam prontos a ajudar-me.

Sumário

1. RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
2. INTRODUÇÃO.....	1
2.1 <i>Bothrops jararacussu</i>	2
2.2 Lesão e reparo tecidual	3
2.3 Soroterapia	4
2.4 Terapia de Fotobiomodulação	5
2.5 LBI e acidentes ofídicos	6
2.6 Laser e reparo tecidual	7
3. OBJETIVO	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	9
4.2 Células C2C12 musculares	9
4.3 Cultivo celular	9
4.4 Preparação de monocamadas de células C2C12 para ensaios com o veneno...	10
4.5 Irradiação com laser de baixa intensidade	10
4.6 Migração celular	11
4.7 Ensaio de western blot	11
4.8 Ensaio de ELISA	12
4.9 Ensaio de produção de Glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).....	13
4.10 Ensaio de produção de glutathiona (GSH)	13
4.11 Ensaio de produção de superóxido dismutase (SOD)	14
4.12 Ensaio de produção de TBARS	14
4.13 Ensaio de produção de Oxido Nitrico (NO)	15
4.14 Ensaio de produção de Peroxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	15
4.17 Análise estatística	16
5. RESULTADOS	17
5.1.1 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na viabilidade da células C2C12	19
5.1.2 O efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a migração celular de células C2C12 incubadas com o veneno da <i>B. jararacussu</i>	22
5.1.3 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na expressão de proteínas envolvidas as vias de diferenciação e regeneração muscular.....	23
5.2.1 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a liberação da Citocina IL-6 em células C2C12 incubadas com o veneno da <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	26
5.2.2 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a liberação da citocina IL-1β em células C2C12 incubadas com o veneno da <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	27

5.2.3 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a liberação da citocina TNF- α em células C2C12 incubadas com o veneno da <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	28
5.2.4 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a liberação da citocina IL-10 em células C2C12 incubadas com o veneno da <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	29
5.2.5 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a expressão de Caspase-3 causada pelo veneno de <i>B. jararacussu</i> .(VBjsu)	30
5.2.6 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre expressão de p38 MAPK causada pelo do veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).....	31
5.2.7 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre expressão de NF- κ B causada pelo do veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu).....	32
5.3.1 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) induzida pelo veneno da serpente <i>B. jararacussu</i> . (VBjsu)	33
5.3.2 Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a expressão de Glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) por células C2C12 incubadas com o veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	34
5.3.3 O efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre a expressão de Peroxidação lipídica (TBars) por células C2C12 incubadas com o veneno de <i>B. jararacussu</i> (VBjsu)	35
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Trifosfato de adenosina
CAT- Catalase
ATP – Trifosfato de adenosina
CU⁺- Cobre
DMEM- meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DTNB- Dinitrobenzoico
ECL- Reagente de Quimiluminescência
FBM- Fotobiomodulação
FE²⁺- Ferro
GPX – Glutathiona peroxidase
GSH- glutathiona
H₂O₂- peróxido de hidrogênio
H₃PO₄ - Ácido fosfórico
IL-1B - interleucina 1 beta
IL-6 - interleucina 6
IL-10 – interleucina 10
KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico
LASER - light amplification by stimulated emission of radiation
LBI- laser de baixa intensidade Fosfato monopotássico
LED- light emitting diode
LYS 49 – Fosfolipase Lys 49
LAAO- L-amino acid oxidase
MAPK P38- Mitogen activated protein kinases p38
MEF2- Fatores de transcrição
MDCK- Madin Darcy canine kidney Major
MIOTOXINA BTH TX I E II- Bothropstoxina I E II
MHC- Major histocompatibility complex
MRFS- Fatores reguladores miogênicos
NADPH- nicotiamina adenine dinucleotide phosphate
NaCl- Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato dissódico
NEED (α -naftiletinomino-hidrocloro)
Nf- κ B- fator de necrose
NO- Óxido nítrico
O₂- Oxigênio
Pax 7- fator de transcrição paired box
PBS- tampão fosfato-salino
PIAs2 – Fosfolipase A2
ROS- espécies reativas de oxigênio
SOD- superóxido desmutase
SFB- soro fetal bovino
T Bars – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA- ácido tricloroacético
TNB- tiolato

TBST- solução salina tamponada com tris
TNf- alfa- fator de necrose tumoral
TMRE- (Mitochondrial membrane potencial)
UV – Luz ultravioleta
VBjsu – Veneno de *Bothrops jararacussu*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O efeito da FBM na viabilidade das células C2C12	21
Figura 2	O efeito da FBM sobre o reparo tecidual (lesão) das células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	23
Figura 3	O efeito da FBM sobre a expressão das proteínas envolvidas na via de diferenciação e regeneração muscular.....	25
Figura 4	O efeito da FBM sobre a liberação da citocina IL-6 em células C2C12 incubadas veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	26
Figura 5	O efeito da FBM sobre a liberação da citocina IL-1 beta em células C2C12 incubadas veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	27
Figura 6	O efeito da FBM sobre a liberação de TNF-alfa em células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	28
Figura 7	O efeito da FBM sobre a liberação de IL-10 em células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	29
Figura 8	O efeito da FBM sobre a expressão de caspase-3 causada pelo veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	30
Figura 9	O efeito da FBM sobre a expressão de p38 MAPK causada pelo veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	31
Figura 10	O efeito da FBM sobre a expressão de NF-kb causada pelo veneno da serpente <i>B jararacussu</i>	32
Figura 11	O efeito da FBM sobre a produção de oxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) das células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B jararacussu</i>	33
Figura 12	O efeito da FBM sobre a expressão de glutathiona peroxidase (GPx) e peróxido dismutase (SOD) por células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	34
Figura 13	O efeito da FBM sobre a expressão de peroxidação lipídica (TBars) por células C2C12 incubadas com o veneno da serpente <i>B. jararacussu</i>	35

RESUMO

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* é frequentemente associado com manifestações patológicas locais graves e complexas, o qual inclui edema, bolhas, dermonecrose, hemorragia e mionecrose. O tratamento específico para o acidente botrópico é a utilização do antiveneno, porém sua ação não se estende as manifestações locais. Atualmente, dados da literatura mostram que a fotobiomodulação (FBM), com o laser de baixa intensidade (LBI) tem se mostrado uma ferramenta terapêutica eficaz contra os efeitos locais causados por veneno botrópico. Assim, o presente estudo investigou os efeitos do LBI em mioblastos C2C12 submetidas à ação do veneno de *B. jararacussu* quanto ao seu mecanismo de reparo celular. Para tanto, as células foram incubadas com o veneno (12,5 µg/mL) e imediatamente irradiadas uma única vez com o LBI nos comprimentos de onda (λ) 660 nm e 780 nm, densidade de energia 5 J/cm², potência de 20 mW, energia total 5.0 J, tempo de aplicação de 10 segundos por ponto e as células foram analisadas por 3, 6 e 24 h. O FBM promoveu: (1) Aumento da viabilidade celular observadas através da contagem das células e migração celular observada pelo método de arranhão na camada de célula; (2) favoreceu a regeneração muscular pelo aumento de fatores miogênicos de regeneração (Pax7, Myf5, MyoD e miogenina); (3) diminuição dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios IL-1, IL-6 e TNF- α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10; (4) A expressão de p38MAPK e caspase 3 não foi alterada pelo tratamento com o FBM, no entanto, esse tratamento causou diminuição da expressão de NF- κ B; (5) redução do estresse oxidativo, diminuindo a produção de H₂O₂ e óxido nítrico e aumentando os níveis de Glutathiona peroxidase (GPx), não houve diferença entre a expressão de superóxido dismutase (SOD) e Peroxidação lipídica (TBars). Juntos, esses resultados sugerem que proteção da célula muscular pelo LBI parece estar relacionada com o aumento de fatores miogênicos bem como a modulação de mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

Palavras-chave: *B. jararacussu*, laser de baixa intensidade, mioblasto, mionecrose, viabilidade.

ABSTRACT

Envenoming caused by Bothrops snakes is often associated with severe and complex local pathological manifestations, which include edema, blisters, dermonecrosis, hemorrhage and myonecrosis. The specific treatment for botropic accidents is the use of antivenom, but its action does not extend to local manifestations. Currently, data from the literature show that photobiomodulation (PBM), with low-level laser (LLL) has been shown to be an effective therapeutic tool against local effects caused by botropic venom. Thus, the present study investigated the effects of LLL on C2C12 myoblasts subjected to the action of *B. jararacussu* venom regarding its cell repair mechanism. To this end, the cells were incubated with the venom (12.5 µg/mL) and immediately irradiated once with the LLL at the wavelengths (λ) 660 nm and 780 nm, energy density 5 J/cm², power of 20 mW, total energy 5.0 J, application time of 10 seconds per point and the cells were analyzed for 3, 6 and 24 h. The PBM promoted: (1) Increase in cell viability observed through cell count and cell migration observed by the scratch method in the cell layer; (2) favored muscle regeneration by increasing myogenic regeneration factors (Pax7, Myf5, MyoD and myogenin); (3) decreased levels of pro-inflammatory mediators IL-1, IL-6 and TNF- α and increased anti-inflammatory cytokine IL-10; (4) The expression of p38MAPK and caspase 3 was not altered by the treatment with PBM, however, this treatment caused a decrease in the expression of NF- κ B; (5) reduction of oxidative stress, decreasing the production of H₂O₂ and nitric oxide and increasing the levels of Glutathione peroxidase (GPx), there was no difference between the expression of superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidation (TBars). Together, these results suggest that protection of the muscle cell by LBI seems to be related to the increase of myogenic factors as well as the modulation of inflammatory mediators and oxidative stress.

Key words: *B. jararacussu* Low-level laser, myoblast, myonecrosis, viability.

INTRODUÇÃO

Os acidentes causados pôr serpentes peçonhentas constituem, ainda, um sério problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo. Devido a sua incidência e gravidade, em 2009, a organização mundial da saúde (WHO) incorporou o envenenamento por serpentes na lista de doenças tropicais negligenciadas (www.who.int/neglected_diseases/diseases/en).

As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos na América Latina pertencem ao gênero *Bothrops*, da família *Viperidae*. No Brasil, aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos são provocados por serpentes desse gênero, sendo também consideradas as mais agressivas ⁽¹⁾. Os acidentes causados pelas serpentes botrópicas não apresentam alta letalidade (0,31 %), porém devido à alta incidência, são consideradas de grande importância epidemiológica no país ⁽²⁾.

O envenenamento pela espécie *Bothrops* leva a manifestações sistêmicas caracterizadas por náuseas, vômitos, sudorese, hemorragia, hipotensão arterial, insuficiência renal e ocasionalmente choque, além de graves manifestações locais como dor, edema de instalação precoce e caráter progressivo, equimoses, hipóxia e necrose tecidual ⁽³⁻⁵⁾.

A mionecrose local é uma consequência comum nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*. A literatura indica que a mionecrose é causada por uma família de proteínas denominadas miotoxinas, componentes dos venenos botrópicos, as quais possuem características de fosfolipases A₂ (PLA₂ – são enzimas que clivam o ácido graxo na posição de dois dos fosfolipídeos, hidrolisando a ligação entre a segunda cauda do ácido graxo e a molécula de glicerol, comumente encontradas em tecidos de mamíferos e em venenos de aracnídeos, insetos e serpentes). A PLA₂ e atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, por se ligarem e alterarem a membrana plasmática ^(6,7). Essas miotoxinas induzem dano tecidual proeminente, de forma que, as alterações morfológicas são observadas

a partir de 15 minutos de inoculação do veneno ⁽⁸⁾. A miotoxicidade pode, ainda, ser consequência da isquemia dos vasos da microcirculação e de artérias intramusculares ^(6, 9).

2.1 *Bothrops jararacussu*

A serpente *Bothrops jararacussu* está distribuída na América do Sul, habitando a mata Atlântica. Essa serpente causa 0,8 a 10% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil ⁽⁴⁾. O envenenamento causado por esta serpente tem grande mortalidade quando comparada com outras serpentes do mesmo gênero ⁽¹⁰⁾, sendo que o grande nível de letalidade, esta atribuída aos 30% de miotoxinas encontrada no veneno ⁽¹¹⁾. A mionecrose é o efeito local mais acentuado causado por este envenenamento ^(5, 12). Ademais, os estudos experimentais mostram que o veneno dessa serpente causa necrose muscular a partir das miotoxinas que atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, causando dano tecidual proeminente ⁽⁸⁾.

Lesão e reparo tecidual

Nas situações de lesão muscular, o processo de formação do novo tecido requer que células mononucleadas quiescentes precursoras se tornem ativas, proliferem, se diferenciem em mioblastos e se fundam para formar os miotubos. Subsequentemente, os miotubos irão sofrer diferenciação e maturação para formar fibras musculares funcionais e reparar as miofibrilas danificadas ⁽¹³⁻¹⁶⁾.

A Miogênese é a formação do tecido muscular, ocorrendo em três estágios, onde os mioblastos atuam fazendo com que haja o acúmulo nos tecidos musculares, promovendo **proliferação** desses mioblastos que são responsáveis pelo **crescimento**, devido ao acúmulo

de células, e a **diferenciação** definitiva em músculos maduros. Esse processo é regulamentado por fatores de transcrição miogênico básico, através da família hélice-alça-hélice (MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4) que são chamados de fatores de regulação miogênica (MRFs) e fator estimulante miócito 2 (MEF2), que irão regular a expressão de vários genes músculo-específicos, como a miosina de cadeia pesada (MHC) e creatina quinase ^(17, 18).

As células da linhagem miogênica em proliferação, positivas para Myf5 e/ou MyoD, são denominadas de mioblastos ⁽¹⁹⁾. Os mioblastos tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão de miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células ⁽¹⁹⁾, para finalmente, no processo da miogênese, os miócitos mononucleados se fundirem para formar os miotubos e, o músculo esquelético tornar-se um tecido altamente especializado caracterizado por fibras musculares multinucleadas ⁽²⁰⁾. Ainda, a MyoD é expressada no tecido estriado vivo em várias situações em resposta a diversos estímulos, sugerindo que ela desempenhe um papel importante na plasticidade deste tecido ⁽²¹⁾.

A linhagem C2C12 é um subclone da linhagem de células musculares C2, isoladas de células-satélites de camundongos adultos ⁽²²⁾. Assim, os mioblastos da linhagem C2C12 são um bom modelo para o estudo do crescimento e diferenciação celular, porque apresentam a maioria das características de células musculares de humano. ^(23, 24).

2.3 Soroterapia

O tratamento preconizado para o acidente botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico, que é altamente eficaz contra os efeitos sistêmicos, no entanto, não neutralizam com eficiência os efeitos locais. Os estudos experimentais edema e mionecrose apenas quando o anti-veneno é administrado rapidamente após o envenenamento ⁽²³⁾

Neste sentido, Camey et al, 2002^(24,25), estudaram o efeito farmacológico do veneno de cinco espécies botrópicas brasileiras e verificaram que o antiveneno foi efetivo na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. Porém, os efeitos locais não são neutralizados pelo uso de antiveneno e os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, até o momento, nenhum não foi esclarecido.

Devido à falta de proteção local pelo soro antibotrópico, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia. Uma possibilidade que começa a ser investigada, na neutralização dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos, é a utilização de fotobioestimulação^(3, 28-39). Nosso grupo de pesquisa e outros têm relatado os benefícios da fotobioestimulação no efeito local induzido por veneno botrópico. Neste sentido, estudos efetuados com a fotobiomodulação (FBM) mostraram uma diminuição da mionecrose^(3, 28, 33, 35), inflamação^(29, 34), dor⁽³⁶⁾, edema⁽³⁷⁾ e hemorragia⁽³⁴⁾ após a aplicação de diferentes espécies de veneno botrópico, *in vivo*. Embora diferentes estudos tenham mostrado a eficácia da fotobiomodulação contra a reação local induzida por venenos botrópico, o mecanismo pelo qual a fotobioestimulação exerce seus efeitos, não é conhecido.

2.4 Terapia com Fotobiomodulação (FBM)

A palavra *laser* é uma sigla que corresponde “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, a qual significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada por Radiação”⁽³⁸⁾. A ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular. Quando o laser é aplicado nos tecidos a luz é absorvida por fotorreceptores localizados nas células, sendo capaz de modular as reações bioquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações em cadeia mitocondrial, resultando em síntese de ATP^(39, 40).

A terapia com a FBM é considerada como um recurso bioestimulante em tecidos, por meio de seus efeitos biológicos, tais como analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes⁽³⁸⁾.

A FBM estimula um grande número de processos biológicos incluindo o crescimento celular, a proliferação⁽⁴¹⁾ e a diferenciação^(42, 43). *In vitro*, o efeito na proliferação pelo FBM tem sido estudado em vários tipos celulares como os fibroblastos, células endoteliais, keratinócitos, células musculares, mioblastos e outros tipos celulares.⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾ Ainda, foi demonstrado que a irradiação da FBM estimula a proliferação de células satélites musculares, a angiogênese e expressão de fatores de crescimento, desempenhando assim uma função importante na regeneração muscular⁽⁴⁸⁾.

2.5 LBI e acidentes ofídicos

Estudos do nosso grupo demonstraram uma redução significativa de mionecrose induzida por veneno de *Bothrops jararacussu* e das miotoxinas BthTX- I e II após tratamento utilizando FBM, esse efeito da FBM foi verificado pela diminuição na concentração de creatina quinase e redução das áreas de mionecrose do músculo gastrocnêmico de camundongos após a administração do veneno de *Bothrops jararacussu*.^(30; 35) Esses dados corroboram os de Dourado et al., (2003)⁽³¹⁾ que demonstraram uma diminuição considerável da mionecrose induzida pelo veneno de serpente *Bothrops moojeni*, após tratamento com a FBM, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana plasmática⁽³¹⁾. Ademais, Doin-Silva, et al. (2009)⁽³⁾, observaram que o tratamento com a FBM causou uma melhora da transmissão neuromuscular e uma redução do desenvolvimento de mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararacussu* na preparação de nervo-músculo *in situ*.

Ainda, nosso grupo demonstrou a eficácia da FBM na resposta inflamatória local e hemorragia após lesão por veneno de *Bothrops jararacussu*⁽²⁹⁾ e *Bothrops moojeni*⁽³⁴⁾ no qual os camundongos foram submetidos à laserterapia combinada com antiveneno,

resultando em diminuição de edema, redução do influxo leucocitário e hemorragia após a lesão. Esses dados sugerem que a FBM possa ser uma ferramenta promissora para minimizar a gravidade dos efeitos locais do envenenamento botrópico.

2.6 Laser e reparo tecidual

O processo de reparo constitui uma reação tecidual dinâmica, a qual compreende diferentes fenômenos, tais como: inflamação, proliferação celular e síntese de elementos constituintes da matriz extracelular, incluindo as fibras colágenas, elásticas e reticulares. ⁽⁴⁹⁾

Atuando em nível celular, a FBM provoca modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, atuando no aumento do metabolismo, na proliferação e maturação celular, na quantidade de tecido de granulação e na diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização. ^(50, 51)

Entre os efeitos bioestimulantes mediados pela FBM no processo de reparo tecidual, destacam-se: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo à produção de colágeno por estas últimas células; a inibição secretória de alguns mediadores químicos; a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local. ^(50, 52) Ainda, a fotobiomodulação vem se mostrando promissora nos efeitos favoráveis na modulação do estresse oxidativo pela diminuição da ROS ⁽⁵³⁾ e o aumento da atividade enzimática antioxidantes, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) ⁽⁵⁴⁾

3. OBJETIVO

3.1 Geral:

Este projeto tem como objetivo geral analisar o conhecimento das ações da FBM sobre células musculares submetidas à lesão por veneno de *Bothrops jararacussu*.

3.2 Específicos

Para tal, foram estabelecidas três abordagens:

1. Estudo do efeito da FBM sobre os mecanismos de regeneração muscular quanto à:

- viabilidade pela contagem celular;
- migração celular por simulação de lesão na camada de células;
- a expressão das proteínas envolvidos na via de regeneração: Pax7, MyoD, miogenina, Myf5 e Caspase-3 por através da técnica de Western Blot;

2. Estudo do efeito da FBM sobre a resposta inflamatória quanto à:

- expressão proteica de MAPK p38- α e NF- κ B por Western Blot;
- liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IL-10) por ensaio imunoenzimático;

3. Estudo do efeito da FBM sobre os mecanismos de estresse oxidativo quanto à:

- produção de H₂O₂ por ensaio de fluorescência;
- peroxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- atividade da Superóxido dismutase (SOD) por redução do nito-blue tretazolium;
- atividade da GSH pela mensuração da oxidação do NADPH;
- atividade de peróxido de hidrogênio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 Veneno de serpente *B. jararacussu* (VBjsu)

Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes *B. jararacussu*, 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 da utilização.

4.2 Células musculares C2C12

As células, provenientes da linhagem de mioblastos C2C12, foram gentilmente doadas pelo professor José Ernesto Belizário, do Instituto de Ciências Biomédicas - USP/SP. As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab).

4.3 Cultivo Celular

Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornarem subconfluente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, foi realizada uma nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente a ressuspensão em 1 ml de meio DMEM. 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 de 96 poços.

4.4 Preparação de monocamadas de células musculares para ensaios com o veneno

A partir das culturas celulares obtidas como descrito no item 5.3, foram feitas as diluições necessárias para a semeadura das células em placas de 96 poços ou lamínulas de vidro. Assim, 1×10^4 célula/poço foram semeadas em placas de 96 poços e colocadas em estufa numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, por 24 horas. Após esse período as células foram incubadas com o veneno, diluídos em meio DMEM, na concentração de 12,5 µg/mL (49), ou meio DMEM somente (controle) e incubadas por 1, 6 ou 24 h.

4.5 Irradiação laser de baixa Intensidade (LBI): O dispositivo laser utilizado foi o Laser da marca DMC® modelo Thera Lase e os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do LBI.

Meio ativo	InGaAlP e AsGaAl
Comprimento de onda	660nm e 780 nm
Densidade de energia	5 J/cm ²
Energia total	5.0 J
Potência de saída	20 mW
Densidade de potência	0.33 mW/cm ²
Área irradiada	0.3 cm ²
Área do feixe	0,04 cm ²
Modo de aplicação	Pontual
Tempo	10 segundos

As células foram irradiadas imediatamente após a adição do veneno na cultura, e foi aplicada 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.

A cultura de mioblastos foi dividida em quatro grupos. Controle: células que foram incubadas com meio de cultura DMEM; VBjsu: células que foram incubadas com VBjsu; VBjsu + 660 nm: células que foram incubadas com VBjsu e imediatamente tratadas com laser (λ 660 nm); VBjsu + 780 nm: células que foram incubadas com VBjsu imediatamente tratadas com laser (λ 780 nm).

4.6 Migração celular

Para este ensaio as células foram contadas, um dia do experimento, nas placas foram preparadas com uma lamínula estéril em cada poço (0,13-0,16mm GLASSCYTO), plaqueado sobre cada lamínulas e em seguida as células foram plaqueadas na quantidade de 2×10^3 células em cada poço, com as células tratadas com o veneno e irradiadas com o LBI, esta retornou para a estufa, no dia seguinte após a adesão celular em fluxo laminar, com ponteira estéril foi simulado uma ferida nas células, em todos os grupos e observado ao microscópio invertido (ECLIPSE TE 2000 UI, NIKON, MILVILLI, NY,EUA) os grupos foram fotografados após as feridas, nos tempos de 0 e 24 h. As células foram analisadas, morfológicamente, por coloração de hematoxilina e eosina (H & E), as fotos foram tiradas em (objetiva no aumento de 20x).

4.7 Ensaio de western blot

Foi realizado a coleta das células, para o ensaio de expressão de proteínas de MAPK p38- α e NF-K β para a via de inflamação e para a via de regeneração Pax7, Myod ,miogenina, Myf5 e caspase 3, no tempo de 6 horas. Para tanto, os sobrenadantes foram removidos e preparadas as amostras. As amostras foram pipetadas em mini-géis de acrilamida a uma concentração de 10 a 12% (w/v) em gel de SDS-PAGE, com 1% de glicerol (w/v) e 0,1% de SDS durante 50 min (para visualizar as bandas) a uma amperagem constante de 20 mA por gel ou durante 155 min, com voltagem a 100 V para garantir a separação de bandas de maior peso, durante a corrida. Todas as amostras foram aplicadas com um marcador de proteínas de peso molecular conhecido – Precision Plus ProteinTM Standards (Bio-Rad). Em seguida foi feita a transferência para membranas de Nitrocelulose (Bio-Rad), previamente hidratadas, utilizando um dispositivo de transferência da Bio-Rad, o Mini Trans-Blot Cell, foi submerso em tampão de transferência 1x. Que foi submetido a uma diferença de potencial constante (100V), durante 15 min, para a transferência dos géis para as membranas, em seguida foram coradas com corante ponceau (com o intuito de visualizar a transferência do gel para a membrana, (para revelar as proteínas coradas) em seguida as membranas foram lavadas. Seguindo depois o procedimento de bloqueio das membranas foram mergulhadas em tampão de bloqueio (solução de leite magro em pó 2.5%) com tampão TBST. Por um período de 60 min à temperatura ambiente. Depois do bloqueio foram lavadas três vezes com tampão TBST e incubadas overnight, com anti-corpos primários de captura monoclonal anti-citocina para camundongo, diluído em tampão de bloqueio. Depois de três lavagens (dois ciclos de 5 min e um final de 10 min) em tampão TBST, foram em seguida incubadas as

membranas com os anticorpos secundário diluídos em tampão de bloqueio. Depois foram feitas mais três lavagens de 10 minutos, em seguida colocada em soluções (ECL) para a detecção por quimioluminescência (ECL) em equipamento de leitura (Scanner Storm 860 Molecular Imager)

4.8 Ensaio de Elisa

Para o ensaio da determinação dessas citocinas, as células foram plaqueadas na quantidade de 2×10^3 em cada poço por 24 horas para adesão celular. Após incubação com o veneno e aplicação do laser nas células, o sobrenadante foi removido nos tempo de 3, 6 e 24 horas, para o ensaio de Elisa. As dosagens foram feitas com Kit da R&D Systems (menneapolis, MN, USA). As placas de 96 poços, foram adsorvidas com anti-corpo de captura monoclonal anti-citocina para camundongo, diluído em PBS por 12hs. Em seguida as placas foram lavadas com solução de PBS 0,05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos, foram bloqueado com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1h. As placas foram lavadas para a remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras (100 μ l) e as curvas foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2hs. Ao final do período de incubação as placas foram lavadas. O anti-corpo de detecção foi adicionado conjugado a peroxidase e incubado por 2hs. As placas foram novamente lavadas e será adicionado o substrato da peroxidase (tetrametilbenzidina) deixando reagir de 15 a 20 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado solução de parada (H_2SO_4 -2N). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

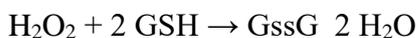
4.11 Ensaio de produção de Glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR).

A Glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo o consumo de NADPH, na reação de redução acoplada a reação da GPx. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro, sendo monitorada a diminuição de absorvância do NADPH (a 340nm).. (Flohe e Gunzler, 1984)⁽⁵¹⁾

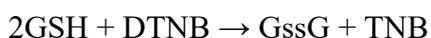
A atividade da enzima GPx foi feita em cubeta de quartzo, onde foram colocados 500 uL do tampão de fosfato (0,1 M; pH 7.0), e 100 uL da amostra, 100 uL de glutathione redutase (0,24 U/mL) e 100 uL de glutathione reduzida GSH. Essa solução foi incubada durante 10 minutos e após foram adicionados 100 ul de NADPH e realizada a leitura, e após 3 minutos foi realizada uma nova leitura para monitoramento do consumo independente de hidroperóxido. Então foi adicionado 100ul de t-buOOH 12 mM, e o decaimento da absorvância foi monitorado durante 5 minutos. As leituras foram feitas em triplicatas. (Leitora de Elisa –SpectraMax Plus 384). Para o cálculo foi considerado a última leitura realizada. O resultado foi dado em mmol/mim/mL.

4.12 Ensaio de produção de glutathione (GSH).

A enzima GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular que contém um TIOL, em sua molécula e é o substrato para a enzima GPx. A GSH pode ser considerada um agente mais importante do sistema de defesa antioxidante da célula protegendo-a contra lesão resultante da exposição a qualquer agente.



O princípio da técnica segundo Beutler , Duron e Kelly (1963)⁽⁵²⁾ Consiste na reatividade da GSH com o ácido dinitrobenzóico (DTNB) formando um tiolato (TNB) de cor amarelada , (quanto maior a presença de GSH, mais acentuada a cor) sendo mensurável em comprimento de onda de 412nm.



O procedimento consiste em precipitar o homogeneizado /sobrenadante (amostra) com o ácido tricloroacético (TCA 12 %) em uma proporção de 1:1, para o procedimento foram colocados 800ul de tampão fosfato , 50ul da amostra precipitada com TCA 12% e 50ul

de DTNB. Foram pipetadas 300ul dessa solução e foi lida em triplicata com filtro no comprimento de onda de 412nm no espectrofotômetro. (Leitora de Elisa –SpectraMax Plus 384). E o resultado foi expresso em mM.

4.13 Ensaio de produção de superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD), é a primeira enzima na eliminação do Ânion superóxido tendo duas formas isoformas e ambas tem função comum de converter O_2^- em H_2O_2 . O princípio da técnica de SOD descrita por Boveris, 1984⁽⁵³⁾. Consiste na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela enzima SOD presente na amostra, considerando que a Adrenalina permaneça estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas. Favorecendo a formação de Adrenocromo (responsável pela coloração roseada). Uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima em 50% a velocidade do detector. A oxidação do pirogalol leva a formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420nm durante 2 minutos. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do pirogalol oxidado.

Foi preparado uma solução de tampão de Glicina 50mM, Adrenalina 60mM, Catalase 10 mM e a amostra diluída 100x (homogenato) sobrenadante foi utilizado pura neste protocolo. A leitura foi realizada em placa de 96 poços com volumes diferentes de amostras (5ul; 10ul; 15ul; 20ul; e 30ul) em duplicata, foram pipetados volumes diferentes de tampão de Glicina para cada volume da amostra (185ul; 180ul; 175ul; 170ul e 160ul) adicionando mais 5ul de Catalase e 5ul de Adrenalina em cada poço. Para a curva de Adrenalina foram utilizados 5ul de Adrenalina e 5ul de Catalase e 190ul de tampão de Glicina, a leitura foi feita em quadruplicata. Em Elisa (Leitora de Elisa –SpectraMax Plus 384) filtro no comprimento de onda de 420nm. O resultado da SOD foi expresso em U SOD/mg proteína.

4.14 Ensaio de produção de TBARS

Esse método utilizado para avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos foi descrito por Hermes- Lima, Willmore e Storey (1995).⁽⁵⁴⁾ O dano em lipídios de membrana e determinado pela formação do subproduto da lipoperoxidação – malondialdeído (MDA), as dosagens de TBARS, poder ser usado como marcadores indiretos da lipoperoxidação, que é uma substância reativa ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBar) formada durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. O MDA reage com o TBARS gerando um produto de coloração rósea que é mesurado em um comprimento de onda 532nm.

A curva padrão foi realizada utilizando-se do MDA como um controle positivo, em concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 50 e 100 μ mol). Foram precipitados 200 μ l da amostra com TCA 10%, que após ser mantida em geladeira durante 15 minutos foi centrifugado a 2200 xg a 4 °C por 15 minutos. Então foram recolhidos 300 μ l do sobrenadante e adicionado a 300 μ l do TBAr. E posteriormente foram pipetados 150 μ l dessa solução de amostra e TBAr em placa de 96 poços e levado para ler em Elisa (Leitora de Elisa –SpectraMax Plus 384) filtro no comprimento de onda de 532nm . O resultado foi expresso em mmol de MDA/mg de proteína.

4.15 Ensaio de produção de Oxido Nitrico (NO)

O Oxido Nitrico (NO) é produzido a partir do aminiácido L-arginina via reação Catalítica de desaminação. A enzima NO, possui duas outras isoformas de enzimas que são responsáveis pela síntese de NO, na forma neural (nNOS) e a forma induzível (iNOS), estimuladas por citocinas inflamatórias, produtos microbianos e perturbações mecânicas .Neste protocolo foi feito utilizando –se do método de Griess, como descrito por Green e, colaboradores (1982).⁽⁵⁵⁾ Para esta avaliação na produção de NO, pelas células C2C12, foram utilizados 100 μ l do sobrenadante em placa de 96 poços, as concentrações de nitrito presentes no sobrenadantes foram obtidos através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando as diluições duplas e seriadas de nitrito de sódio a partir de 200mM até 0,78 mM, as diluições. As amostras foram utilizadas o sobrenadante para o ensaio. O reagente de Griess foi preparado adicionando sulfanilamida a 1% e α -naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) a 1% em 2,5% de H₃PO₄ e foram plaqueado conforme as diluições, em placa de 96 poços em Elisa (Leitora de Elisa –SpectraMax Plus 384) filtro no comprimento de onda de 540 nm.

4.16 Ensaio de produção de Peroxido de Hidrogênio (H₂O₂)

O peroxido de Hidrogênio é utilizado como fonte para outros reagente oxidantes principalmente o radical (OH⁻), formado pela via oxidação de metais de transição como íons de (Fe⁺²) e cobre (Cu⁺). A produção de (H₂O₂) foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari em 1980⁽⁵⁶⁾, para este ensaio foram colocados o sobrenadante das células , ao volume de 100 μ l, ao volume da solução completa de vermelho fenol, contendo: 140mM de Nacl, 10mM de tampão de fosfato de Potássio, pH 7.0, 5,5mM de dextrose , 0,56 mM vermelho de fenol e peroxídase de raiz forte tipo II (0,01mg/ml, Sigma), alíquotas de 100 μ l dessa solução, foram transferida para placa de 96 poços , a oxidação do vermelho de fenol

foi quantificada através da leitura de absorbância no leitor de Elisa (Leitora de Elisa – SpectraMax Plus 384) , utilizando o filtro no comprimento de onda de 620nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e os resultados foram apresentados em mmoles de H₂O₂ /10⁶ células.

4.17 Análise Estatística:

Para a análise dos dados foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) de uma via, com auxílio do software “GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Foram realizados pós teste de Tukey e considerada aceitável quando $p \leq 0,05$. Todas as amostras foram feitas em quadruplicatas e três experimentos independentes.

5. RESULTADOS

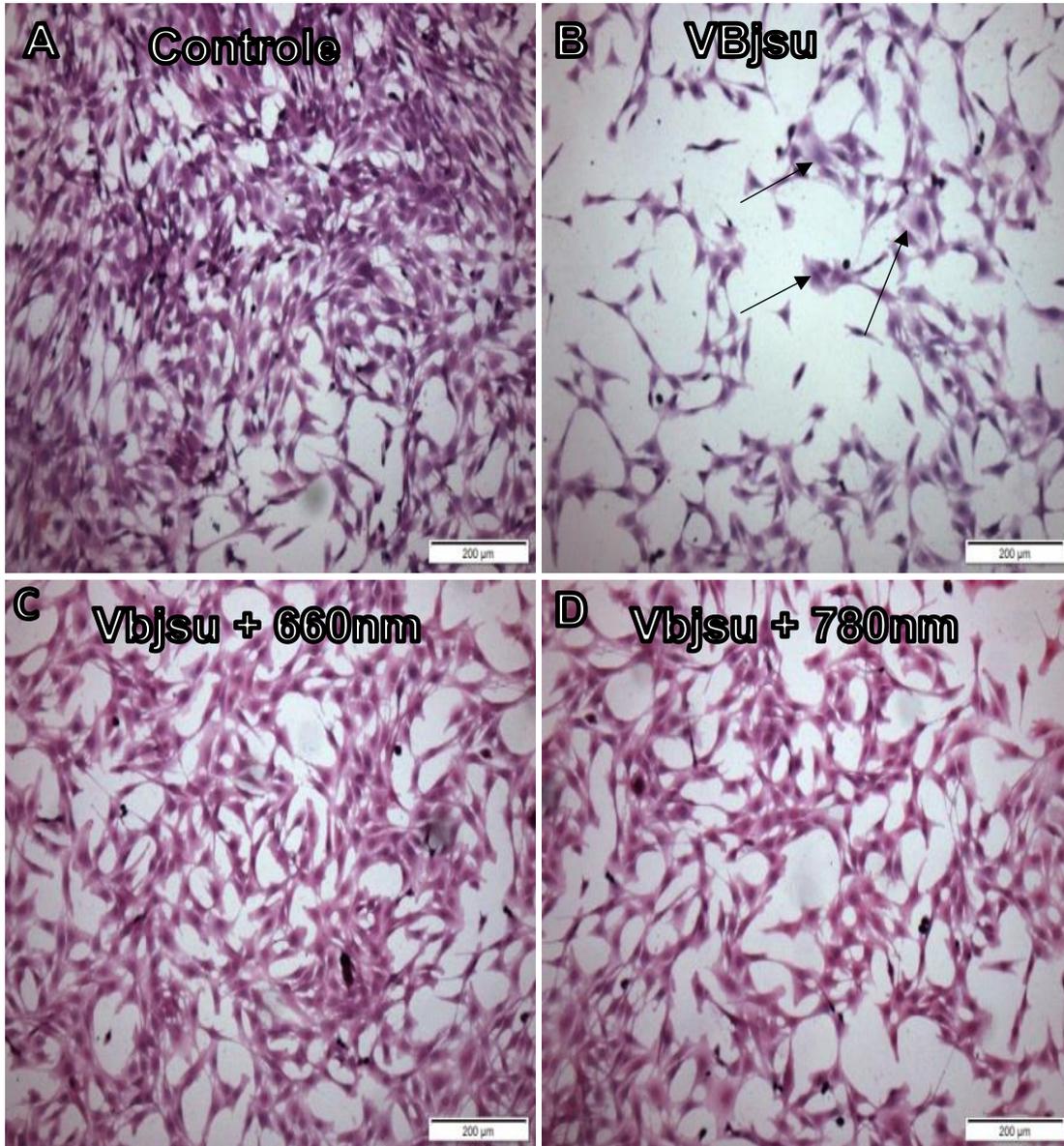
Os resultados serão apresentados em capítulos, de acordo com os objetivos propostos.

5.1 – Capítulo 1 - Estudo do efeito da FBM sobre os mecanismos de regeneração

5.1.1 Efeito da FBM na viabilidade da células C2C12

Para verificar se o veneno de *B. jararacussu* é citotóxico para as células C2C12, foi realizada análise da viabilidade celular após 1 hora de incubação das células com o veneno. Realizamos a contagem de células em diferentes campos e comparamos com a contagem obtida entre os grupos.

A análise da morfologia celular mostrou que as células C2C12 controle (fig. 1A) foram distribuídas homoganeamente no campo cultivado; elas exibiram morfologia típica de células musculares (com suas formas estreladas, núcleo integro, e com algumas células em formato fusiformes) (fig. 1A). Após 1 h de incubação com 12.5 µg/mL de VBjsu foram observadas algumas células arredondadas (citoplasma e núcleo) (seta) e algumas áreas desprovidas de células, indicando morte celular (fig. 1B). A irradiação com FBM restaurou o número de células com aparência morfológica típica de células musculares (fig. 1C e D). A figura 1 E demonstra a análise quantitativa da viabilidade celular após a incubação com o veneno e FBM.



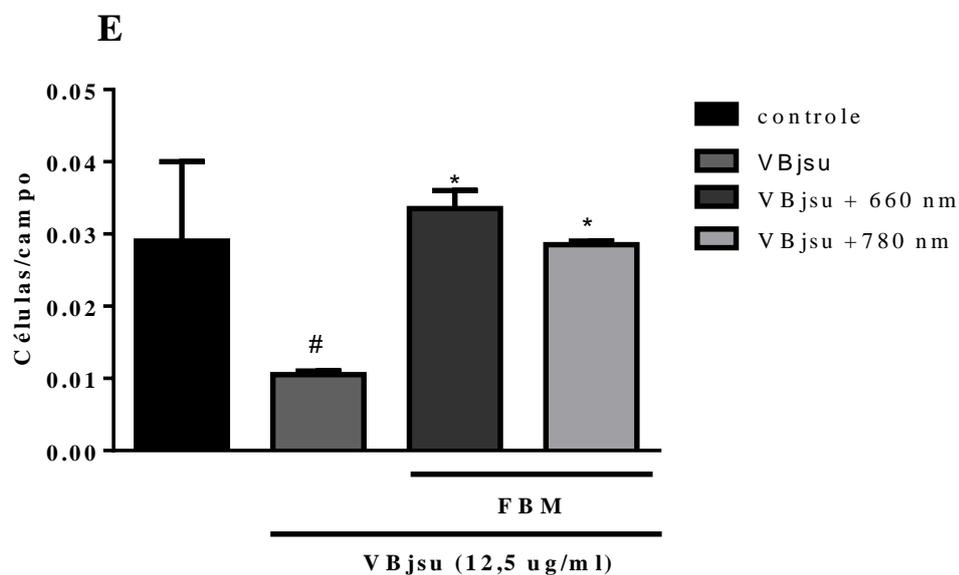


Figura 1: Efeito da FBM na viabilidade das células C2C12. As células musculares C2C12 foram incubadas em placas de 6 poços por 24h para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno de bothrops (12,5 µg/mL) a um dos grupos e no outro além do veneno as células foram irradiadas imediatamente com o laser, nos comprimentos de onda 660nm e 780nm, o grupo controle foi incubado apenas com meio de cultura DMEM. Todos os grupos foram incubados por 1 hora. A viabilidade celular foi realizada por contagem das células, em diferentes campos microscópicos, as células foram analisadas, morfologicamente, por coloração de hematoxilina e eosina (H & E), as fotos foram tiradas em (objetiva no aumento de 20x).

. * P <0,05 versus grupo veneno; # P <0,05 versus grupo controle.

5.1.2 O efeito da FBM sobre a migração celular das células C2C12 incubadas com o veneno da *B. jararacussu*.

O ensaio de migração celular foi realizado para avaliar o efeito da FBM sobre a migração das células C2C12. As figuras 2 A, B, C e D demonstram as células antes de fazer a ferida nas mesmas. As figuras 2 E, F, G e h demonstram o tempo imediatamente após a ferida nas células. O risco de ferida nas células do grupo controle foi quase completamente fechado após 24 h de incubação (fig. 2I). No grupo onde foi aplicado o veneno de *B. jararacussu* (12,5 µg/mL), resultou na supressão da cicatrização, observe que mesmo no local onde não foi feita a ferida, também não tem células viáveis (fig. 2J). No entanto, verificou-se que a FBM foi capaz de quase completamente fechar o risco da ferida, nos comprimentos de onda 660 nm (fig.2 K) e 780 nm (fig.2 L), semelhante ao grupo controle (fig. 2 I).

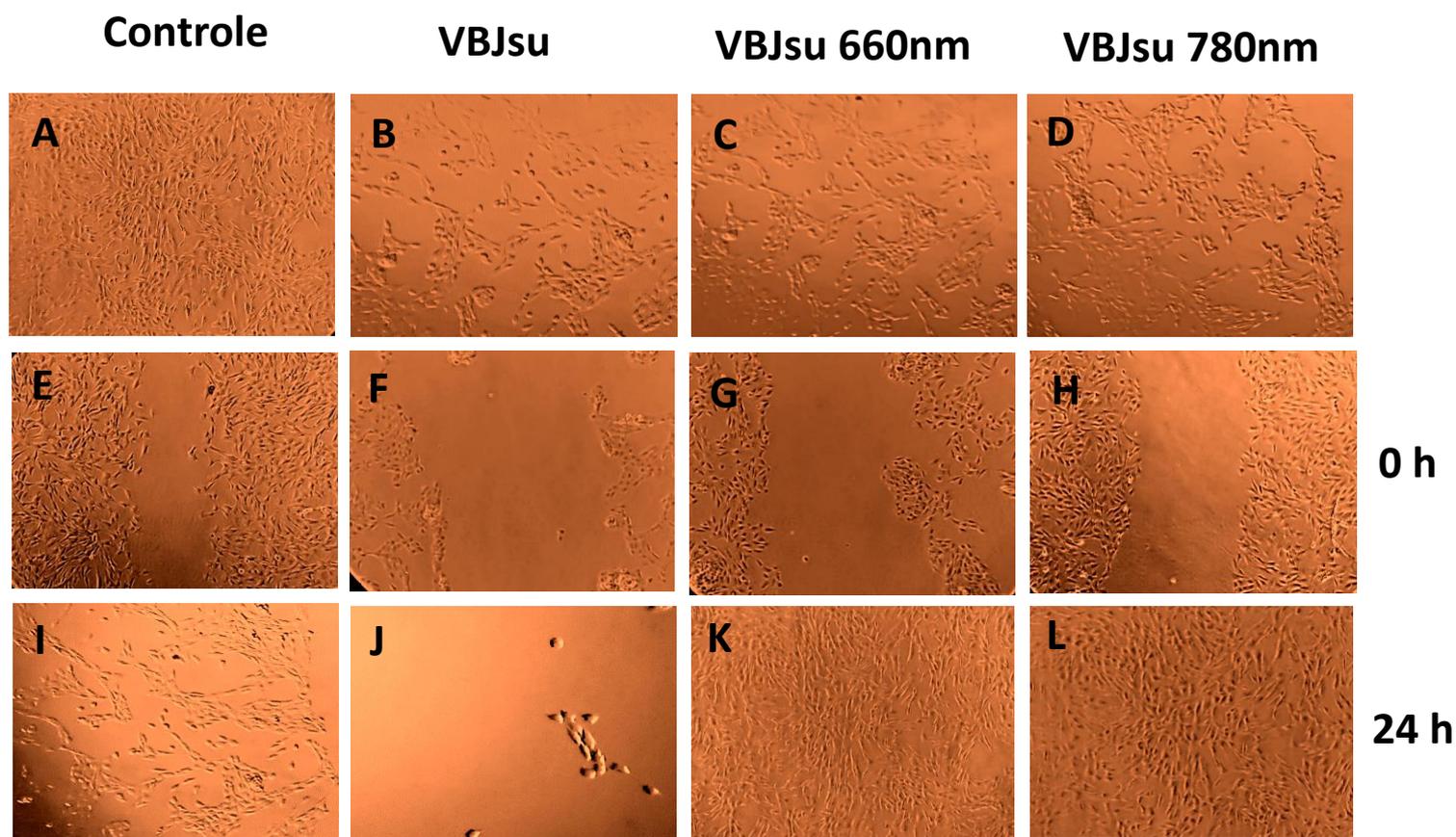


Figura 2. Efeito do veneno *B. jararacussu* na migração de mioblastos C2C12. Células C2C12 foram incubadas em lamínulas por 24 h para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno de Bothrops (12,5 µg/mL) em um dos grupos, e nos outros dois grupos, além do veneno, as células foram imediatamente irradiadas com LBI nos comprimentos de onda 660nm e 780nm; todos os grupos foram incubados por 24 h. O grupo controle foi incubado apenas com meio de cultura DMEM. Fotografias de feridas em monocamadas de células controle (A, E e I), células fotografadas imediatamente após feridas (E, F, G e H) e células após 24 h da ferida e aplicação do laser 660nm e 780nm (I, J, K e L). Foram tiradas fotos de diferentes campos em microscópicos invertido com objetiva no aumento de 20x.

5.1.3 Efeito da FBM na expressão de proteínas envolvidas nas vias de diferenciação e regeneração muscular.

Portanto, neste estudo também avaliamos por western blot os níveis de *MyF5*, Pax 7, MyoD e miogenina envolvidos na diferenciação e regeneração muscular (fig. 3A). O veneno de Bjsu causou diminuição significativa de todos os fatores miogênicos avaliados sendo essa diminuição de 18, 80, 40 e 50% para *MyF5*, Pax 7, MyoD e miogenina, respectivamente em relação ao grupo controle (fig. 3B, C, D e E). A aplicação do LBI aumentou significativamente a expressão desses fatores miogênicos em 74, 45, 29 e 27% no comprimento de 660 nm e 90, 90, 64 e 76% no comprimento de 780 nm para *MyF5*, Pax 7, MyoD e miogenina, respectivamente em relação ao grupo veneno (fig. 3B, C, D e E). A β -actina foi utilizada como controle de carregamento.

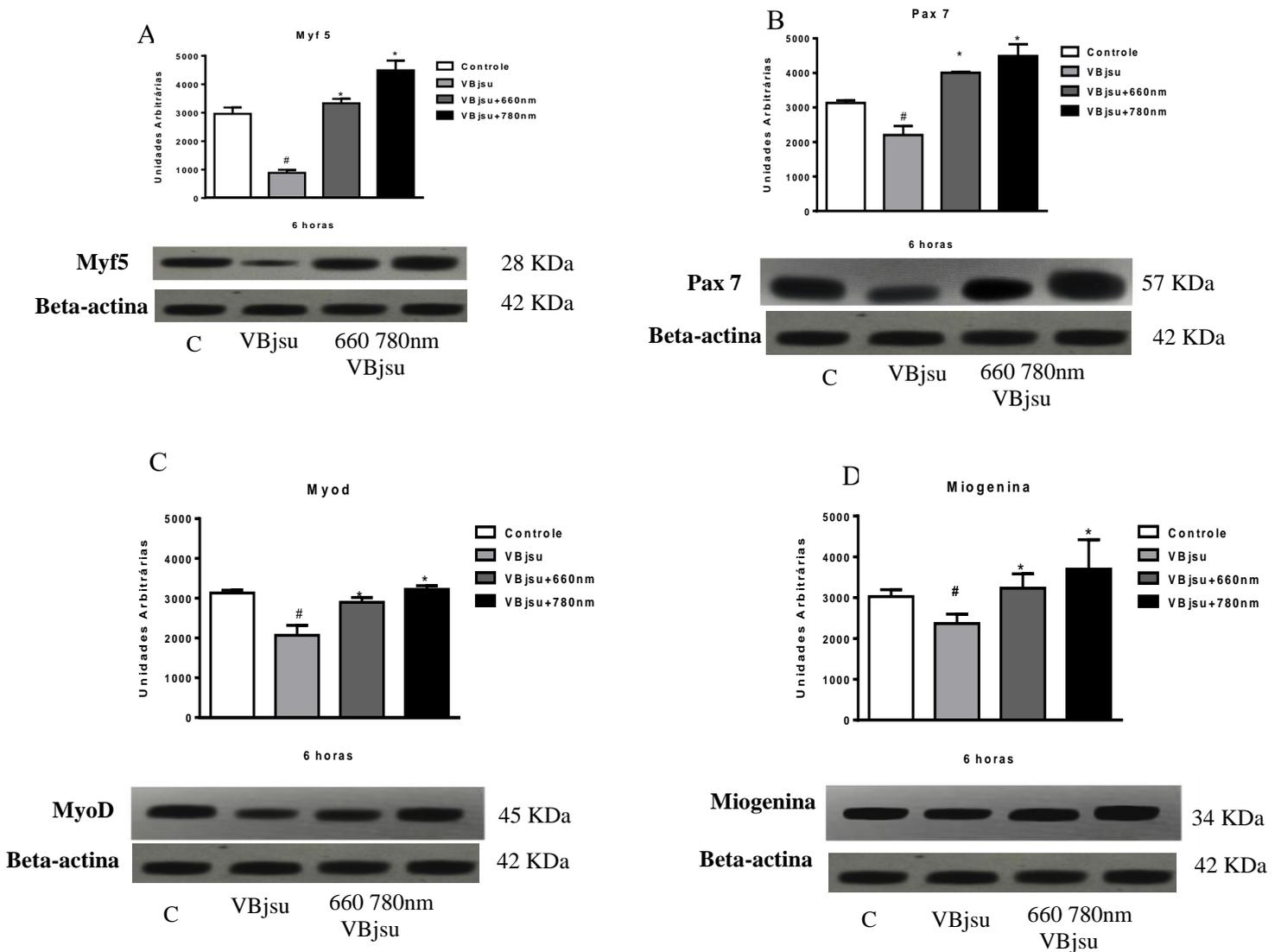


Figura 3. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na expressão de proteínas envolvidas nas vias de diferenciação e regeneração muscular. As bandas obtidas por western Blotting para a análise foi feito em gel de SDS-PAGE (10% poliacrilamida). As amostras de proteína das células C2C12 incubadas com 12,5 µg/mL do veneno de *B. jararau* (Bjsu) e tratamento com LBI (Bjsu + 660nm e 780nm), foi feito por ensaio de Bred Ford (concentração de 50ug/ml de proteína) para o ensaio de imunotransferência de *Myf5* (A), *Pax7* (B) *MyoD* (C) e *Miogenina* (D) e gráficos mostram o tempo de incubação de 6 horas. A β -actina foi usada como controle de carregamento. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado. * P < 0,05 versus grupo veneno; # P < 0,05 versus grupo controle.

5.2 – Capítulo 2 - Estudo do efeito da FBM sobre a resposta inflamatória

5.2.1 Efeito da FBM sobre a liberação da Citocina IL-6 em células C2C12 incubadas com o veneno da *B. jararacussu* (VBjsu).

A ação veneno de *B. jararacussu* sobre as células C2C12 na expressão da citocina IL-6 foi avaliada no sobrenadante das células após 3, 6 e 24 h da aplicação do veneno e tratamento com a FBM. O Veneno causou aumento dessa citocina em todos os tempos analisados (fig. 4 A,B e C). O LBI causou uma diminuição na liberação de IL-6 causada pelo VBjsu nos tempos de 3, 6 e 24 h no comprimento de onda de 660 nm (fig.4 A, B e C) e no tempo de 3 h no comprimento de onda de 780nm (fig.4 A).

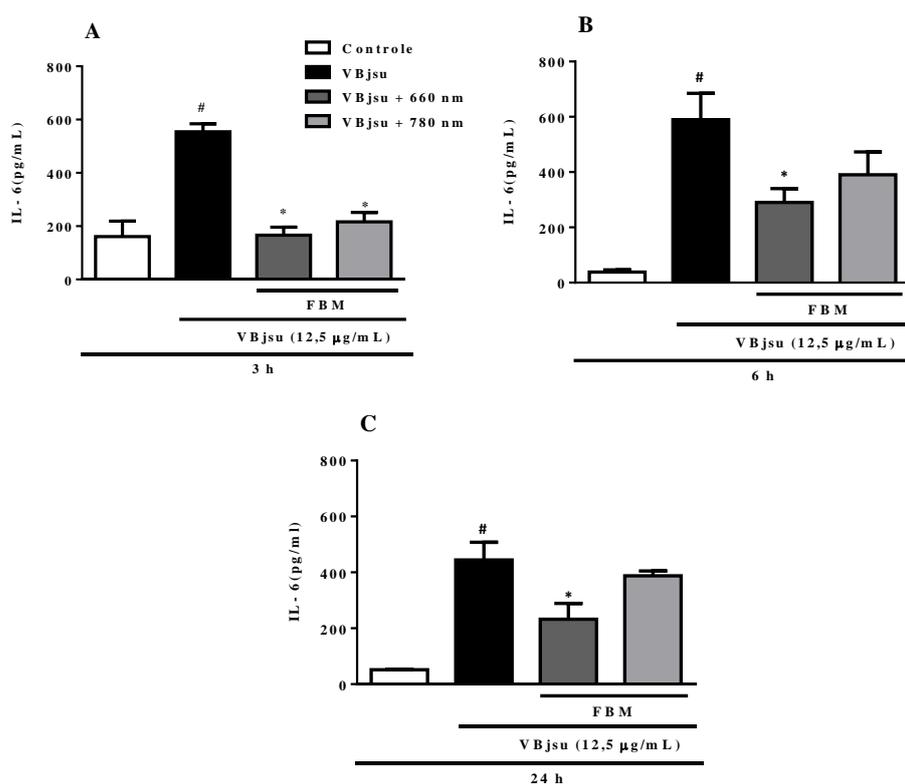


Figura 4. Efeito da FBM na liberação da citocina IL-6 induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu). Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno (12,5 µg/mL) foi adicionado, as células foram imediatamente irradiadas com LBI nos comprimentos de onda 660 e 780nm e incubadas por 1 h. Cada valor representa a média ± SEM de três

experiências independentes. # $p < 0,05$ em relação ao controle, * $p < 0,05$ em relação ao veneno

5.2.2 Efeito da FBM sobre a liberação da citocina IL-1 β em células C2C12 incubadas com o veneno da *B. jararacussu* (VBjsu).

A ação do VBjsu sobre as células C2C12 na expressão da citocina IL-1 β , foi avaliada no sobrenadante das células após 3, 6 e 24 h da aplicação do veneno e tratamento com a FBM. O veneno de *B. jararacussu* foi capaz de aumentar significativamente a liberação da IL-1 β em todos os tempos avaliados (fig. 5 A, B e C). A irradiação com o LBI em ambos os comprimentos de onda 660nm e 780nm reduziu significativamente a liberação de IL-1 β em comparação ao grupo veneno (660nm; $55,5 \pm 2,4$ ng/mL), (780nm ; $55,5 \pm 2,4$ ng/mL), no tempo de 6 h (fig. 5B). A irradiação não promoveu diminuição dessa citocina nos tempos de 3 e 24 h (Fig. A e C).

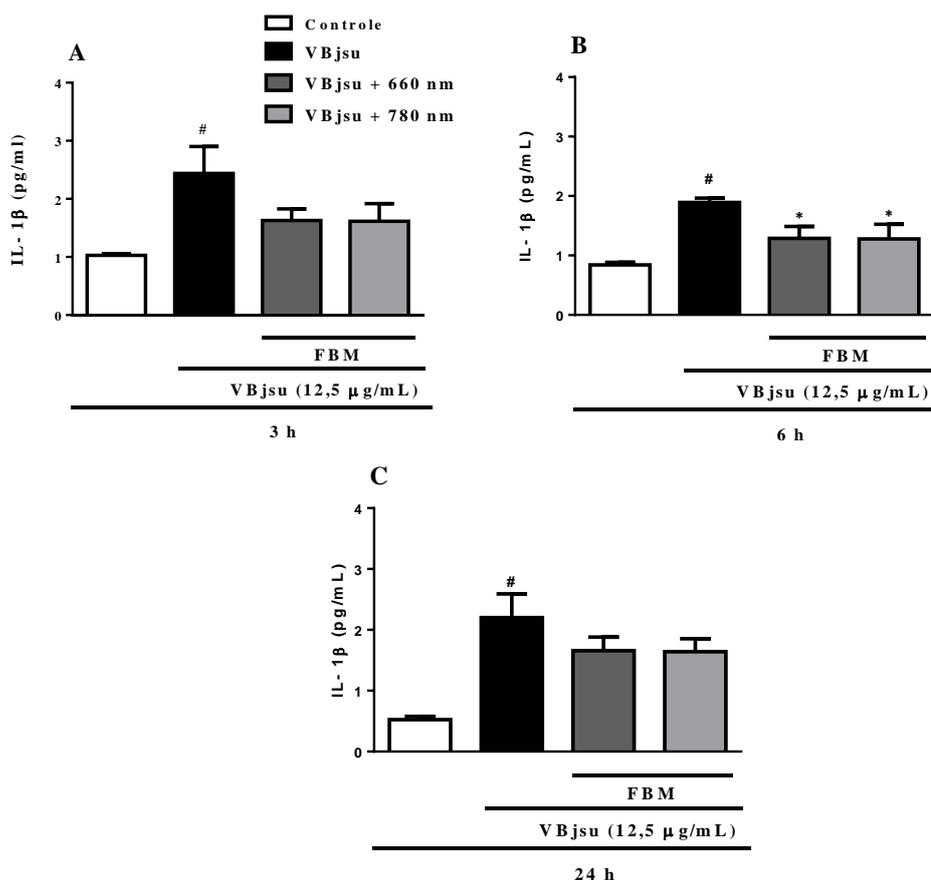


Figura 5. Efeito da FBM na liberação da citocina IL-1 β induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu). Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno (12,5 μ g/mL) foi adicionado, as células foram imediatamente irradiadas com LBI no comprimento de onda 660 e 780nm e incubadas por 1 h. Cada valor representa a média \pm SEM de três

experiências independentes. # $p < 0,05$ em relação ao veneno, * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.2.3 Efeito da FBM sobre a liberação da citocina TNF- α em células C2C12 incubadas com o veneno da *B. jararacussu* (VBjsu).

Para verificar a ação do VBjsu sobre as células C2C12 na expressão da citocina TNF- α , avaliamos o sobrenadante das células após 3, 6 e 24 h da aplicação do veneno e tratamento com a FBM. Veneno causou aumento dessa citocina em todos os tempos analisados (fig. 6 A, B e C). O tratamento com o LBI, reduziu a liberação de TNF- α em todos os tempos estudados e pelos dois comprimentos de onda avaliados (fig. 6A, B e C).

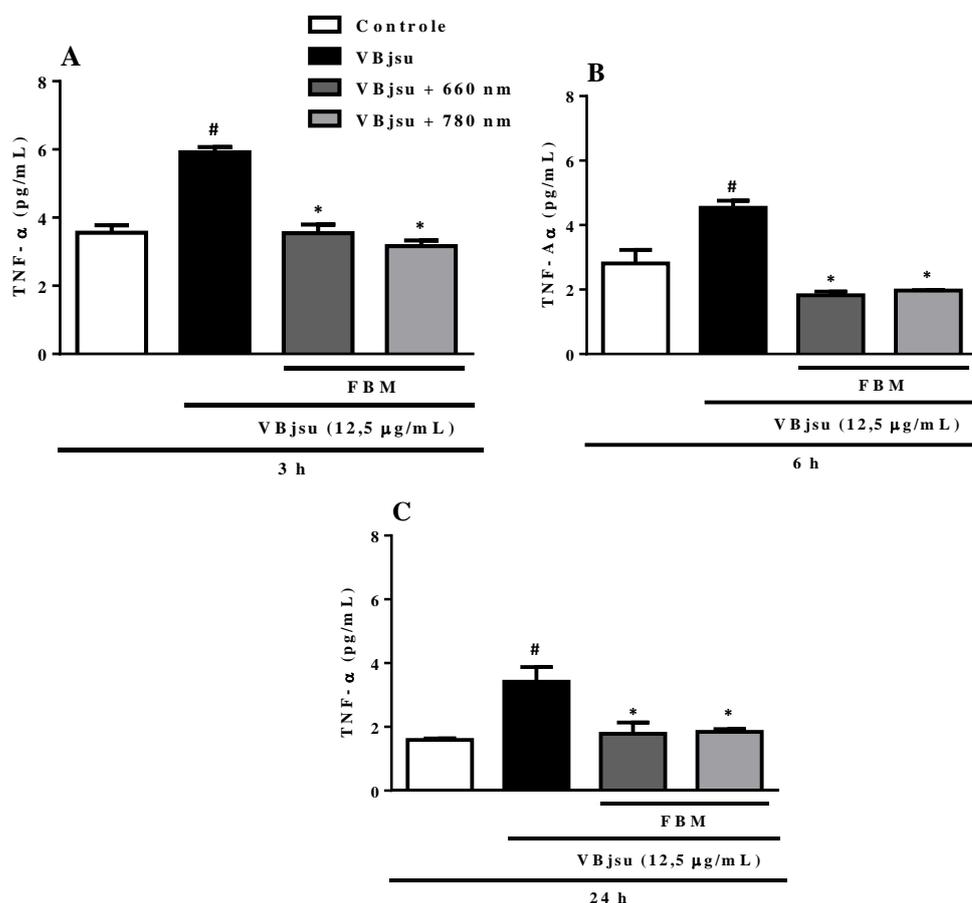


Figura 6. Efeito da FBM na liberação da citocina TNF- α induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu). Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas para adesão celular por 24h. Após esse período, o veneno (12,5 μ g/mL) foi adicionado, as células foram imediatamente irradiadas com LBI no comprimento de onda 660 e 780nm e incubadas por 1 h. Cada valor representa a média \pm SEM de três experiências independentes. # $p < 0,05$ em relação ao controle, * $p < 0,05$ em relação ao veneno.

5.2.4 Efeito da FBM sobre a liberação da citocina IL-10 em células C2C12 incubadas com o veneno da *B. jararacussu* (VBjsu).

A ação do VBjsu sobre as células C2C12 na expressão da citocina IL-10 foi avaliada no sobrenadante das células após 3, 6 e 24 h da aplicação do veneno e tratamento com a FBM. O Veneno causou diminuição dessa citocina em todos os tempos analisados (fig. 7). O tratamento com a FBM aumentou a liberação de IL-10 nos tempos de 1, 6 e 24 h pelos dois comprimentos de onda avaliados (fig. 7 A, B e C).

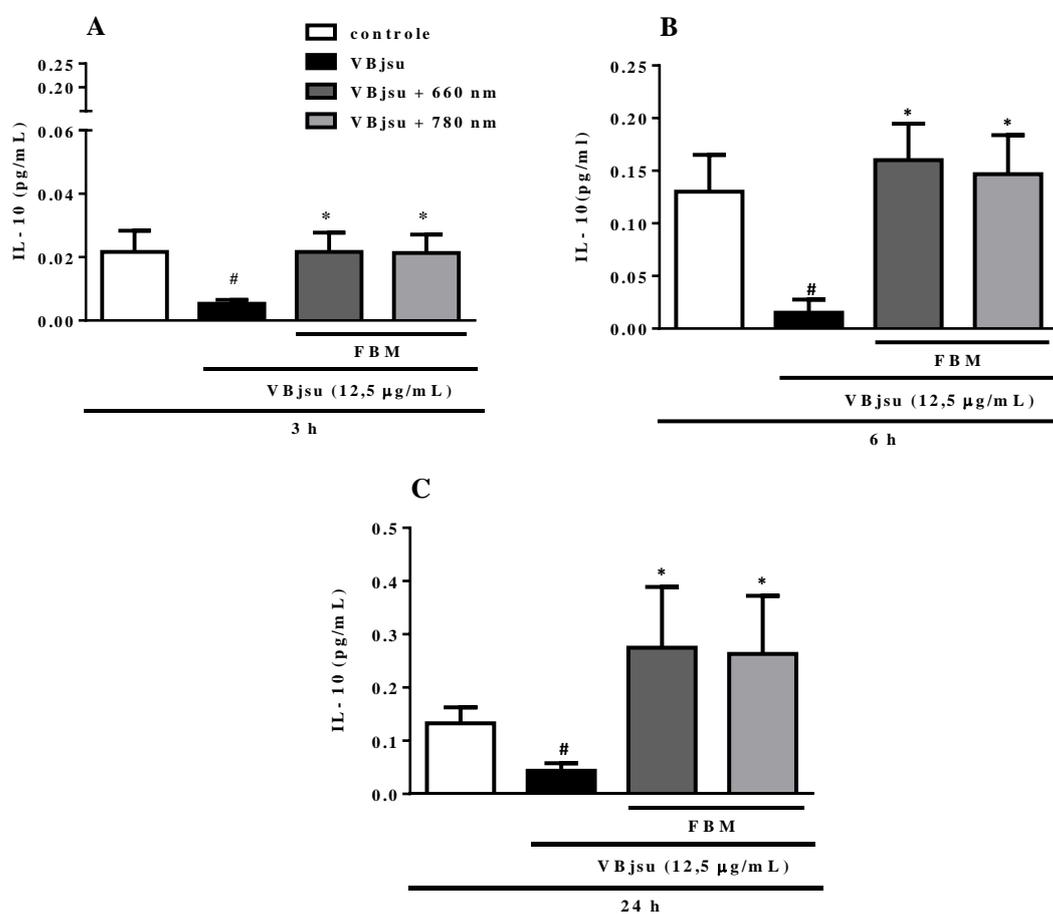


Figura 7. Efeito da FBM na liberação da citocina IL-10 induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, e foi adicionado o veneno (12,5 µg/mL), as células foram imediatamente irradiadas com LBI nos comprimentos de onda 660 e 780nm e incubadas por 1 h. Cada valor representa a média ± SEM de três experiências independentes. # p < 0,05 em relação ao controle, * p < 0,05 em relação ao veneno.

5.2.5 Efeito da FBM sobre expressão de Caspase-3 causada pelo veneno de *B. jararacussu*.

A expressão de caspase-3 foi mensurada através da técnica de Western blot, e está demonstrada na figura 8. Não houve diferença na expressão de caspase-3 entre os grupos estudados (fig. 8 A e B).

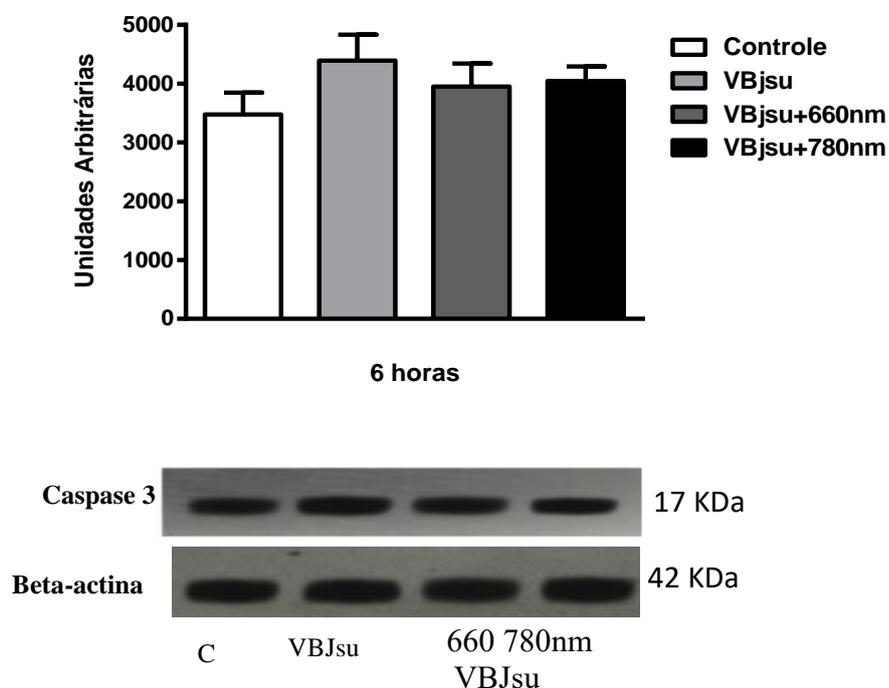


Figura 8. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na expressão de caspase 3. As bandas obtidas por western Blotting para a análise foi feito em gel de SDS-PAGE (10% poliacrilamida). As amostras de proteína das células C2C12 incubadas com 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do veneno de *B. jararacussu* (Bjsu) e tratamento com LBI (Bjsu + 660nm e 780nm), foi feito por ensaio de Bred Ford (concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína) para o ensaio de imunotransferência de caspase 3 e gráficos mostrando o nível de proteína analisado após 6 horas. A β -actina foi usada como controle de carregamento. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado, sem diferenças estatísticas entre os grupos.

5.2.6 Efeito da FBM sobre expressão de p38MAPK causada pelo do veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

A expressão de p38 MAPK foi mensurada através da técnica de Western blot, e está demonstrada na figura 17. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos veneno e controle (fig 9 A e B). No entanto, a irradiação com o LBI no comprimento de onda de 660 nm causou diminuição significativa na expressão de p38 MAPK quando comparado o grupo veneno com o controle (fig. 9 A e B).

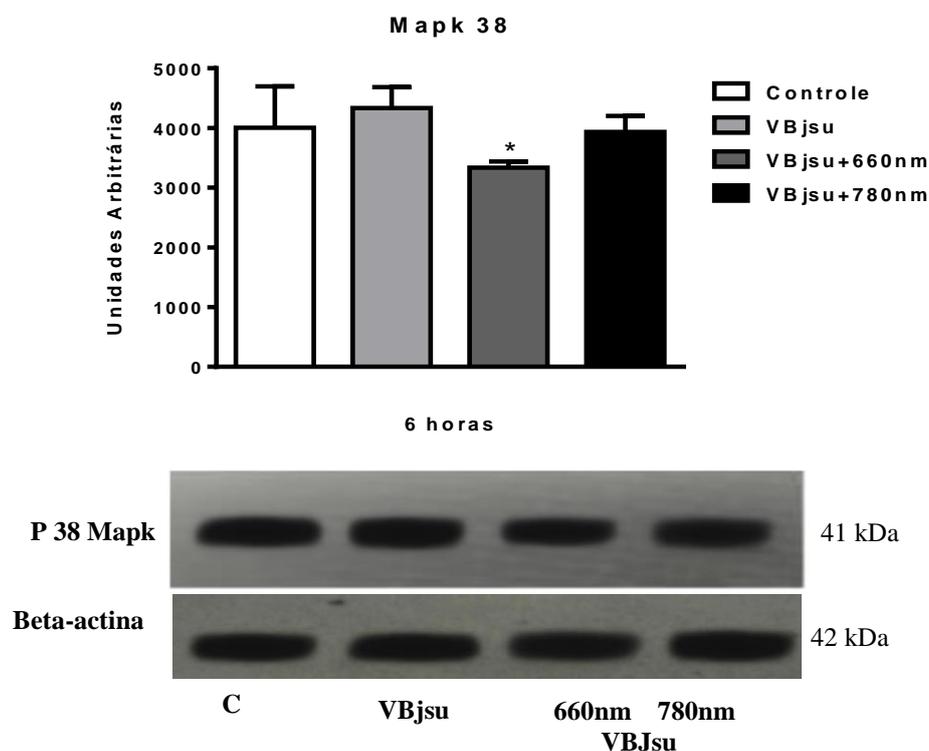


Figura 9. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na expressão de p38 MAPK. As bandas obtidas por western Blotting para a análise foi feito em gel de SDS-PAGE (10% poliacrilamida). As amostras de proteína das células C2C12 incubadas com 12,5 µg/mL do veneno de *B. jararacussu* (Bjsu) e tratamento com LBI (Bjsu + 660nm e 780nm), foi feito por ensaio de Bred Ford (concentração de 50ug/ml de proteína) para o ensaio de imunotransferência de p38MAPK. Analisado após 6 horas. A β-actina foi usada como controle de carregamento. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado. * p <0,05 em relação ao veneno.

5.2.7 Efeito da FBM sobre expressão de NF- κ B causada pelo do veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

A expressão de NF- κ B foi mensurada através da técnica de Western blot, e está demonstrada na figura 18. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa entre os grupos veneno e controle (fig 10 A e B). No entanto, a irradiação com o LBI causou diminuição significativa na expressão de NF- κ B quando comparado ao grupo veneno e com o controle (fig. 10 A e B).

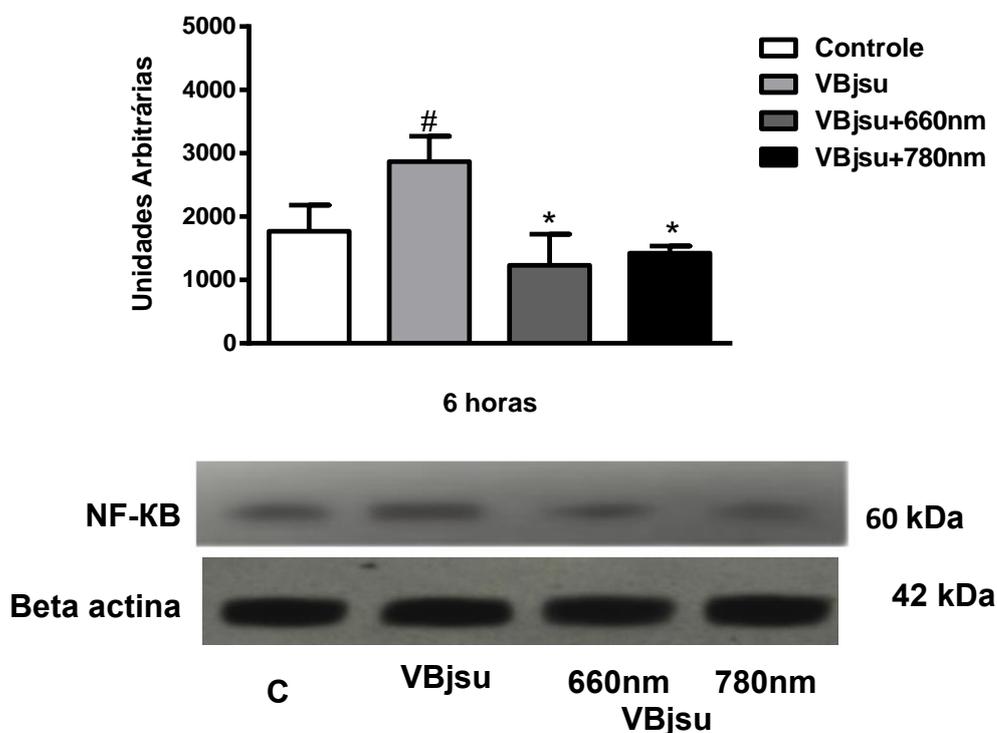


Figura 10. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na expressão de NF- κ B. As bandas obtidas por western Blotting para a análise foi feito em gel de SDS-PAGE (10% poliacrilamida). As amostras de proteína das células C2C12 incubadas com 12,5 μ g/mL do veneno de *B. jararacussu* (Bjsu) e tratamento com LBI (Bjsu + 660nm e 780nm), foi feito por ensaio de Bred Ford (concentração de 50ug/ml de proteína) para o ensaio de imunotransferência de NFK-beta analisado após 6 horas. A β -actina foi usada como controle de carregamento. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, e o valor relativo da intensidade da banda foi quantificado. # P <0,05 versus grupo controle. * P <0,05 versus grupo veneno.

5.3 – Capítulo 3 - Estudo do efeito da FBM sobre os mecanismos de estresse oxidativo.

5.3.1 Efeito da FBM sobre a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) induzida pelo veneno da serpente *B. jararacussu*.

Para verificar a ação veneno de *B. jararacussu* sobre as células C2C12 na produção de óxido nítrico (Fig. 11 A) e na produção de peróxido de hidrogênio (Fig. 11B), foi realizada o cultivo celular, após 1 hora de incubação das células com o VBjsu. Podemos observar na (Fig.11A) que o grupo veneno liberou quantidade de (NO) significante maior que em células controle. A FBM diminuiu a produção de forma significante a quantidade de NO induzido nas células sobre a ação do veneno. Ainda, o veneno causou produção de H₂O₂ que foi estatisticamente maior que o controle. A FBM reduziu essa liberação, quando comparada ao grupo veneno (Fig. 11B)

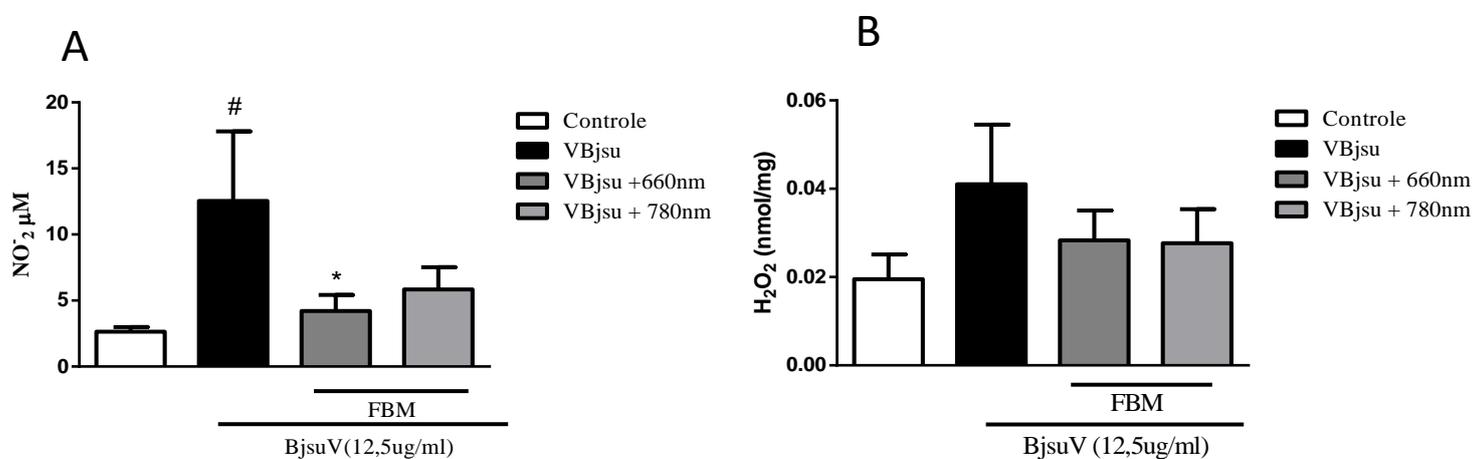


Figura 11. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na produção de NO e H₂O₂ induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu). Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno (12,5 µg/mL) foi adicionado, as células foram imediatamente irradiadas com LBI e incubadas por 1 h. A concentração de NO (A), no sobrenadante foi avaliada pelo método de Griess e o mesmo foi feito para avaliar a concentração de H₂O₂ (B), no sobrenadante pelo método do fenol vermelho. Cada valor representa a média ± SEM de três experiências independentes. #p <0,05 em relação ao controle; * p <0,05 em relação ao veneno.

5.3.2 Efeito da FBM sobre a expressão de Glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

Para verificar a ação do VBjsu e o efeito da FBM sobre as células C2C12 na produção de GPx e SOD, foram feitas análises por espectrofotometria. Observamos diminuição da liberação de SOD pelo grupo veneno e aumento causado pelo laser no comprimento de onda de 660 nm (Fig. 12A). Não houve diferença entre os grupos em relação a produção da enzima GPX (Fig. 12B).

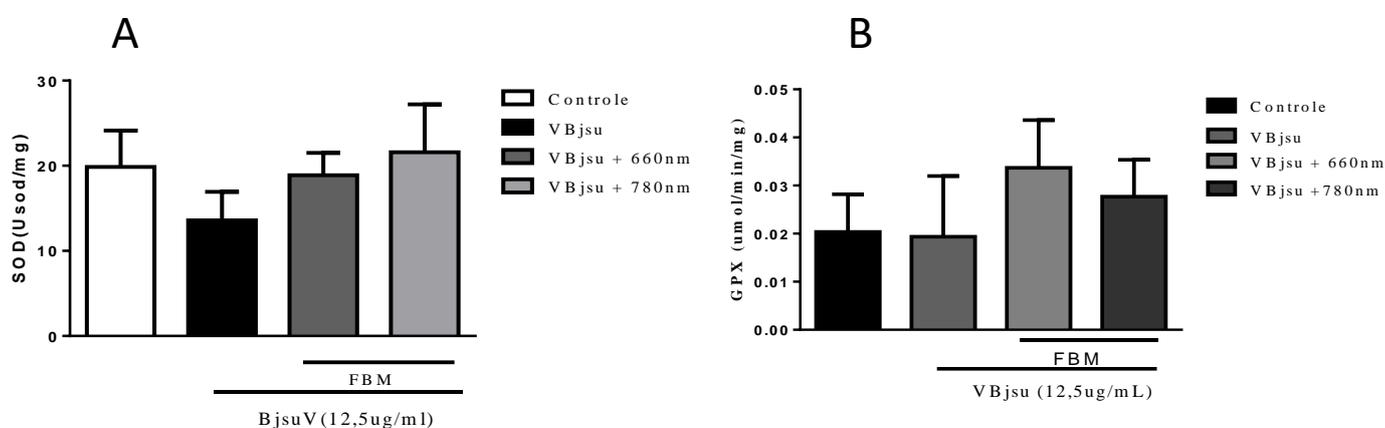


Figura 12. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na produção das enzimas antioxidantes SOD e GPx, induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu) em células C2C12. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, o veneno (12,5 µg/mL) foi adicionado e as células foram imediatamente irradiadas com FBM e incubadas por 1h. A concentração de SOD (A) e GPx (B) foi avaliada o sobrenadante, pelo método de espectrofotometria. Cada valor representa a média ± SEM de três experiências independentes. #p <0,05 em relação ao controle; * p <0,05 em relação ao veneno.

5.3.3 O efeito da FBM sobre a expressão de Peroxidação lipídica (TBars) por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu* (VBjsu).

A ação do VBjsu e o efeito da FBM sobre as células C2C12 sobre a peroxidação lipídica foi avaliado pelo método de Elisa. Nosso resultado demonstrou que não houve diferença na produção de peroxidação lipídica (TBARS) pelos mioblastos entre os grupos estudados (fig. 13).

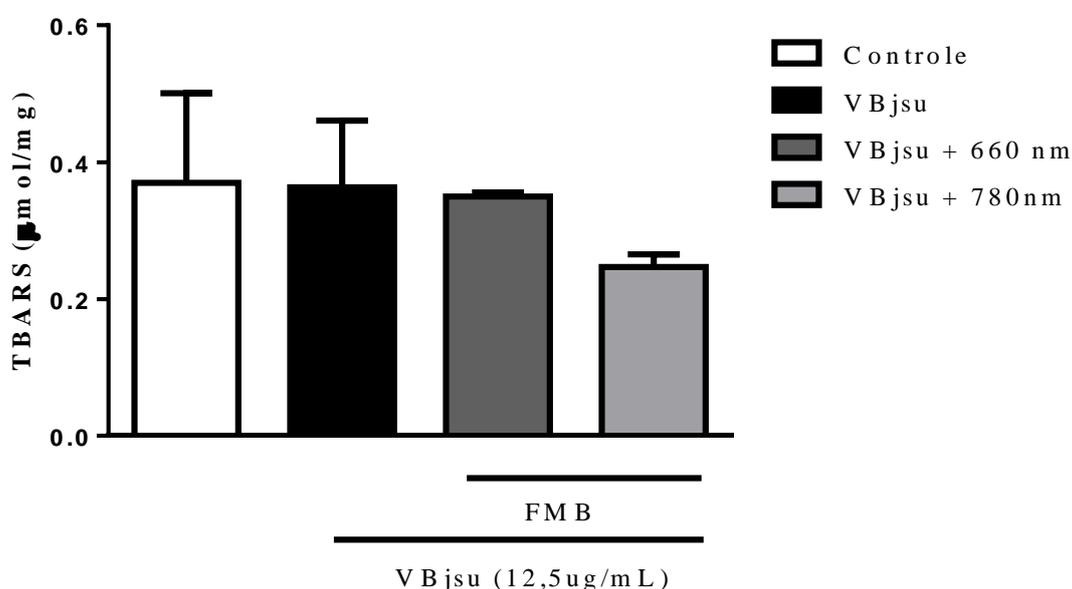


Figura 13. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na peroxidação lipídica induzida pelo veneno de *B. jararacussu* (VBjsu) em células C2C12. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular, foi adicionado o veneno (12,5 µg/mL), as células foram imediatamente irradiadas com a FBM e incubadas por 1 h, A concentração de peroxidação lipídica foi avaliada o sobrenadante, pelo método de ELISA. Cada valor representa a média ± SEM de três experiências independentes.

6. DISCUSSÃO

O envenenamento por picada de serpente é considerado uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com importância clínica e social em todo o mundo ^{41, 42}. Além da letalidade, uma das consequências mais graves desses acidentes causados por animais peçonhentos, especialmente no caso de serpentes da família Viperidae, está associada a dano tecidual levando a sequelas permanentes como perda tecidual e disfunção ^{36, 43}.

A mionecrose é um efeito severo do envenenamento da serpente *B. jararacussu*, que provoca perda de massa muscular e dificuldade na sua regeneração ⁴⁴. A necrose muscular causada por esse veneno é atribuída, principalmente, a ação de miotoxinas com estrutura de PLA₂, que correspondem 30% do veneno bruto ⁴⁵. Gutiérrez & Lomonte (1995) ⁴⁶, demonstraram que a ação desse veneno causa necrose muscular por ação direta dessas miotoxinas na membrana da célula muscular, levando a um dano grave, podendo ocasionar amputação no membro afetado. No presente estudo, avaliamos a toxicidade do veneno da serpente *B. jararacussu* em células musculares. Para isso, utilizamos a linhagem de mioblastos C2C12. O uso de células C2C12 como alvo de venenos/toxinas de serpentes foi sugerido como um modelo viável *in vitro* para o estudo de mecanismo(s), uma vez que ele se correlata com a miotoxicidade do veneno *in vivo* ⁴⁷.

Nossos resultados demonstraram que o veneno bruto da serpente *B. jararacussu* apresentou efeito tóxico nas células musculares, resultando na diminuição da viabilidade celular, confirmando assim o efeito miotóxico desse veneno. Esses resultados corroboram os efeitos citotóxicos do veneno bruto e de componentes do veneno, como metaloproteínases e miotoxinas, estudados na linhagem de células C2C12 ^{26, 40, 47-50}. Ainda, Collares-Buzato et al., (2002) ⁵¹ apresentaram dados semelhantes aos encontrados em nosso estudo, demonstrando um efeito citotóxico direto do veneno bruto da serpente *B. moojeni* em cultura

do epitélio tubular renal. Além disso, Villalobos et al. (2007)⁵², mostraram dano da membrana celular em miotubos em cultura incubados com miotoxina II (Lys49) isolada do veneno da serpente *B. asper*. Esses estudos confirmam o potente efeito de lesão celular causado por veneno de serpentes desse gênero, mesmo de espécies diferentes.

A literatura sugere a fotobiomodulação (FBM), utilizando o laser de baixa intensidade (LBI) ou o light emitting diode (LED), como uma terapia alternativa para o tratamento de acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, por sua capacidade de diminuir a inflamação, hemorragia, hiperalgesia e a mionecrose após envenenamento botrópico experimental^{34, 35, 37}. No entanto, os mecanismos biológicos relacionados à proteção causado pela FBM contra os efeitos locais induzidos por veneno botrópico não são compreendidos. Neste trabalho, investigamos alguns mecanismos envolvidos na capacidade da FBM para proteger as células musculares contra o veneno de *B. jararacussu*.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que a FBM, utilizando o LBI nos comprimentos de onda de 660 nm e 780 nm e dose de 5 J/cm² reduziram consideravelmente a citotoxicidade causada pelo veneno em mioblastos em cultura. Dourado et al., (2003)³⁵ e Barbosa et al., (2009)³⁷ em estudo *in vivo* demonstraram que a laserterapia em comprimento de onda em 904 e 685 nm e densidade de energia de 4 J/cm² e 4.2 J/cm², respectivamente, foi capaz de diminuir significativamente a mionecrose induzida pelo veneno, demonstrado pela histologia e confirmando por níveis reduzidos de liberação de creatino quinase. Em estudo anterior do nosso grupo²⁶, evidenciamos que o LBI foi capaz de proteger as células C2C12 contra o veneno de *B. jararacussu* e ainda mostramos que o laser nos comprimentos de onda 660 nm e 780 nm além de proteger, causa aumento de fatores miogênicos nestas células, aumentando a proliferação celular. Ademais, o LBI foi capaz de proteger células endoteliais em cultura contra o efeito do veneno de *B. jararaca*²⁷.

Como os resultados demonstraram que o tratamento com o laser nos comprimentos de onda de 660nm e 780nm, causaram citoproteção em células C2C12 quando incubadas com o veneno de *B. jararacussu*, fomos verificar o efeito do LBI nesses dois comprimentos de ondas sobre as características migratórias dessas células em situação de lesão, efeito importante para o processo de regeneração muscular ⁶³. Nosso resultado revelou que, além da citoproteção em células C2C12 causada pelo LBI (660 nm e 780 nm), essas células também foram capazes de migrar, verificado através do fechamento da ferida realizada em lamínulas, o que pode significar um dos mecanismos para a melhora no processo de regeneração muscular visto em experimentos *in vivo* ³³.

Após a lesão tecidual, a miogênese é iniciada pela ativação das células miogênicas através da expressão sequencial de fatores de transcrição e ativação de genes que culminam na regeneração tecidual. As células satélites quiescentes expressam Pax7, enquanto a ativação resulta na expressão de MyoD, e a miogenina é expressa posteriormente no processo de diferenciação. Em estudo anteriores demonstramos que o LBI (660 nm e 780 nm) protegeu as células C2C12 do efeito do veneno de *B. jararacussu* e ainda promoveu a diferenciação dessas células através do aumento dos fatores miogênicos MyoD e miogenina, avaliado 4 dias após a incubação com o veneno ²⁶. A diferenciação envolve várias alterações celulares, incluindo fisiologia, arquitetura estrutural e funções ⁶⁴. Portanto, todo evento no curso da diferenciação deve ser acompanhado por expressão coordenada e/ou repressão de certos subconjuntos de genes ⁶⁵. O fator miogênico Pax7 é um regulador chave da diferenciação de células musculares em populações específicas de células-tronco adultas e é um bom candidato para distinguir células-satélite ativadas ⁶⁶. Além disso, a diferenciação das células musculares esqueléticas dos mamíferos é regulada por membros da família MyoD de fatores reguladores miogênicos (MRFs). Estes incluem MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 ⁶⁷. Foi relatado que a miogenina e o MRF4 desempenham um papel na diferenciação terminal

dos mioblastos ⁶⁸. Os MRFs e Pax7 parecem desempenhar papéis críticos durante a ativação, proliferação e diferenciação de células satélites ⁶⁹. Neste estudo avaliamos a capacidade do LBI em promover a diferenciação das células C2C12 em período agudo. Por esse motivo fomos avaliar a ação do laser sobre o veneno na fase crônica do processo inflamatório. Nossos resultados demonstraram que no período de 6 h, o veneno causou diminuição de todos dos fatores miogênicos estudados (Pax7, Myf5, MyoD e miogenina). Não encontramos na literatura estudos *in vitro* demonstrando a capacidade de venenos botrópicos em modular a expressão desses fatores.

A eficiência do FBM em ambos os comprimentos de ondas utilizado (660 nm e 780 nm) demonstrou regeneração do músculo esquelético não apenas melhorando, mas também acelerando a regeneração ⁷⁰. A irradiação com o LBI causou aumento dos fatores miogênicos estudados quando comparados ao veneno, assim, é possível sugerir que houve um aumento da diferenciação causada por ambos os comprimentos λ 660nm e 780nm, pelo menos em parte, ocasionou um aumento desses fatores miogênicos, favorecendo a diferenciação e consequente proliferação celular. Assim, é possível sugerir que a FBM acelera a regeneração muscular, melhorando a miogênese e a diferenciação das células musculares lesionadas pelo veneno, o que reforça que o laser de baixa intensidade pode ser usado como coadjuvante ao tratamento da soroterapia em envenenamento por serpente Bothrops .

A literatura, Lan et al. (30) ⁷⁴ 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 Ca²⁺. Wang et al. (2014) ⁷⁵ mostraram que a irradiação a laser na faixa visível e no infravermelho, bem como na UV, pode modular a função e a expressão dos canais iônicos TRP-V e, em particular, TRP-V1, TRP-V2 e TRP-V4, e a liberação endocitótica de ATP. Neste sentido, em trabalho anterior de nosso grupo demonstramos que a FBM nos comprimento de onda de 660 nm e 780 nm aumenta a

concentração de ATP intracelular ²⁶.

Ainda, segundo Ferraseri et al. (2015)⁽⁹⁴⁾, há uma forte correlação entre o conteúdo de MMP (potencial de membrana mitocondrial) e ATP, medido durante uma ampla faixa de 5 minutos (efeito imediato) a 24h (efeito prolongado). após efeito da FBM, além disso, já foi demonstrado que, em mitocôndrias de células de fibroblastos sem agentes estressores, a FBM também aumentam a síntese de ATP e a atividade do complexo IV mitocondrial de maneira dependente da dose.⁽²⁸⁾

A resposta inflamatória é necessária e crucial para uma resultado positivo da regeneração do músculo esquelético. Neste estudos avaliamos o efeito da FBM (λ660nm e 780nm) sobre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias por células C2C12 após a incubação com o veneno. Verificamos que houve aumento de IL-6 no grupo incubado com o veneno de *B. jararacussu* em todos os tempos estudados. Já foi demonstrado que vários venenos botrópicos induzem a liberação de IL-6 ⁷⁶⁻⁷⁸. A irradiação com o LBI causou diminuição significativa desse mediador inflamatório. Esse resultado está de acordo com Nadur-Andrade et al. (2016) ³⁹ que demonstrou, em modelo animal, ocorre um aumento de IL-6 após exposição ao veneno de *B. moojeni* e o tratamento com LBI promove diminuição desse mediador inflamatório.

Semelhante a liberação de IL-6, verificamos aumento da liberação de IL-1β nas células incubadas com o veneno de *B. jararacussu*. Em nosso modelo, verificamos diminuição dessa citocina após a aplicação do LBI, como mostrado em estudos in vivo, para o grupo que sofreu com a ação do veneno e tratado com laser. E nossos estudos mostram que essa citocina pró-inflamatória esta aumentada em modelo animal após exposição ao veneno de *B. moojeni* ⁷⁹, no modelo celular também se mostrou semelhante em estudos in vitro. Ainda, a IL-1β aparece aumentada também em células endoteliais incubadas com veneno de

B. jararaca e o tratamento com LBI causa redução significativa de seus níveis, mostrando mais uma vez a ação do laser na diminuição do processo inflamatório ²⁷.

No período de 3, 6 e 24 h o veneno causou aumento da citocina TNF- α . Zamuner et al., (2002, 2005) ^{76, 77}, avaliaram a presença de TNF- α nos períodos de 30 min a 12 h após a injeção do veneno de *B. jararaca* e *B. asper* em camundongos e observaram um aumento acentuado dos níveis de TNF- α em todos os intervalos de tempo analisados. Já, um estudo com veneno de *B. atrox* (0,5 μ g/mL) avaliou-se a presença de TNF- α após 1, 4 e 8 horas de exposição ao veneno em peritônio de camundongos e mostrou que após 1 hora de exposição houve aumento de TNF- α , mas após esse tempo o TNF- α não foi mais detectado, podendo estar mais relacionado com a resposta inicial ao processo inflamatório e recrutamento de leucócitos para o local da picada ⁸⁰. Essas diferenças na liberação desse mediador podem estar relacionadas com o veneno estudado, uma vez que os venenos apresentam diferenças em suas composições.

A citocina IL-10 está relacionada com a resolução do processo inflamatório e começa a se elevar num período mais tardio do acidente botropico ⁸¹. Em nosso estudo, no período de 3 h o veneno causou uma diminuição desse mediador inflamatório, em concentração mais baixa em comparação com outros tempos estudados, indicando que a liberação desse mediador, começa a ser detectado no período de 6 e 24 h do envenenamento, e no grupo onde se aplicou o veneno e o laser (λ 660nm e 780nm) causou uma diminuição acentuada dessa citocina. O LBI (λ 660nm e 780nm), foi capaz de aumentar a liberação dessa citocina nos tempos de 3, 6 e 24 h. Já, em estudo com modelo animal que sofreu a ação do veneno de *B. moojeni*, foi verificada a diminuição desse mediador anti-inflamatório no período de 6 h de aplicação do veneno ³⁹. Esses autores observaram também aumento desse mediador com a aplicação do LBI, propiciando assim uma redução da resposta inflamatória local. Embora o principal tratamento para o envenenamento por picada de serpente seja a soroterapia com

soro antiofídico ³, animais tratados apenas com o soro não apresentaram diminuição significativa de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-10 e TNF- α , indicando o LBI como um complemento importante ao tratamento com soro antiofídico para melhora da reação inflamatória local do veneno ³⁹.

A família das proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) está associada a numerosas respostas celulares, como proliferação, mitogênese, oncogênese diferenciação e apoptose (Zhang et al., 2011). A p38 MAPK foi originalmente descoberta como alvo molecular para a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1. Assim, nós avaliamos a expressão da p38 MAPK no tempo de 6 h após a adição do veneno, nossos resultados demonstraram que o veneno não causou alteração dessa proteína nesse período em relação ao controle. No entanto, a irradiação com o laser no comprimento de onda de 660nm, apresentou diminuição significativa da expressão de p38MAPK em relação aos grupos veneno e controle. Foi demonstrado que a L-aminoácido oxidase isolada do veneno de cobra de *Calloselasma rhodostoma*,(Víbora) em sua forma nativa, estimula a quimiotaxia de neutrófilos, um evento com o envolvimento da sinalização intracelular mediada por p38MAPK (Pontes et al., 2016)⁽⁹⁷⁾. Além disso, a crotamina, uma miotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, estimula a atividade fagocítica e citostática de macrófagos em cultura, pela indução de NO e TNF- α via p38 e vias de sinalização NF-Kb (Lee et al., 2016)⁽⁹³⁾. No tempo de 6 h, não observamos aumento da expressão de p38 MAPK, mas a irradiação 660nm, foi capaz de diminuir a expressão basal, sugerindo que mesmo sem a participação com veneno neste efeito, o LBI suprime a sua produção de p38 MAPK.

A literatura demonstra que para a ativação do NF-Kb independente dos estímulos sofridos, pode estar envolvido em alguns desses evento, como aumento de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e no aumento do cálcio intra-celular, pois quando o NF- κ B, não está estimulado ele, encontra-se no citoplasma das células ligado há uma proteína

inibitória o IKB.⁽⁹⁵⁾ O que impede que ocorra a translocação do NF-KB para o núcleo das células, assim com o evento de fosforilação e a degradação do IK-beta, ocorre a translocação e a liberação do NF-kb.⁽⁹⁶⁾ E em nosso estudo mostrou que a ação do veneno botrópico ocasiona a liberação de NF- kb e o laser também foi capaz de inibir a expressão dessa proteína.

Durante o envenenamento, o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tem sido atribuído tanto à lesão tecidual de isquemia- reperusão quanto à reação inflamatória que ocorre após a injeção de veneno⁸². Neste sentido, já foi demonstrado que o veneno de *B. jararaca* e *B. asper* induzem aumento de NO e H₂O₂ e também a formação de peroxinitrito⁸³. Esses autores sugeriram que a formação desses radicais de oxigênio e nitrogênio teria um papel importante na toxicidade causada pelos venenos botrópicos. Nossos achados mostraram que a FBM (λ660nm e 780nm), reduziu a geração de NO causada pelo veneno em células musculares. Assim, é possível sugerir que a proteção causada pela FBM nesses dois comprimentos de ondas utilizado (λ660nm e 780nm), pelo menos em parte, decorra de uma diminuição desses radicais de oxigênio, NO e H₂O₂.

A literatura demonstra que o envenenamento de serpentes do gênero *Bothrops*, pode causar estresse oxidativo/nitrosativo caracterizado por um desequilíbrio entre o sistema pró e o antioxidante⁸². O desequilíbrio no estresse oxidativo pode levar a efeitos extremamente deletérios para organismos vivos e tem sido associado a várias condições fisiopatológicas, incluindo distúrbios hematológicos e reações inflamatórias que resultam na ativação de leucócitos⁸⁴. Nossos resultados mostraram que o veneno não foi capaz de alterar a quantidade de peroxidação lipídica ou de enzimas antioxidantes como a SOD ou Gpx em nosso modelo experimental, no entanto após a irradiação com o LBI (λ660nm e 780nm), as células incubadas com o veneno apresentaram aumento significativo de SOD. Urishi et al., (2009)⁸⁵ propõe que os níveis de antioxidantes são determinantes para a capacidade

regenerativa das células-tronco musculares. Assim, o aumento de SOD após o tratamento das células com o LBI ($\lambda 660\text{nm}$), pode colaborar com a melhora muscular observada em estudos *in vivo*^{33,35}. Não observamos aumento da enzima Gpx, avaliamos essa enzima no período de 1 h de incubação com o veneno, é possível que em horários mais tardios pudesse ocorrer uma maior quantidade da produção dessa enzima.

7. CONCLUSÃO

Considerando as análises de viabilidade e migração celular, bem como as análises moleculares em cultura de células C2C12, podemos concluir que a FBM possui efeito benéfico sobre os mioblastos em resposta a ação do veneno de *B. jararacussu*, conferindo suporte para o entendimento dos mecanismos pelo qual a FBM protege a célula muscular no envenenamento botrópico, uma vez que foi observado:

- Aumento da viabilidade e migração celular;
- Efeito regenerativo, demonstrado pelo aumento de fatores de regulação miogênica como Pax7, Myf5, MyoD e miogenina, além da expressão de NFkB;
- Ação antiinflamatória pela redução das citocinas IL-1, IL-6, e TNF α , e da diminuição de p38 MAPK e aumento da citocina IL-10;
- Redução do estresse oxidativo pela ação do sistema antioxidante; SOD, GPx e TBars.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barraviera, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. JBM, São Paulo, 1993; 65(4): 209-250.
2. 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. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. 2010. *Toxicon* 56: 1223–1235.
4. Milani Junior, R. *et al.*, Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State. Brazil. *QJM*. 1997; 90(5): 323-334.
5. Zamuner, S.R.; da Cruz-Höfling, M.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*, 2004,44: 259–71.
6. Gutierrez, J. M.; Ownby, C. L.; Odell, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.*, 1984; 40: 367-379.
7. 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.
8. Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995; 33: 1405-1424.
9. Queiroz, L.S. & Petta, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1984; 26: 247-253.
10. Sanchez, E. F.; Freitas, T. V.; Ferreira-Alves, D. L.; Velarde, D. T.; DINIZ, M. R.; Cordeiro, M. N.; Agostini-Cotta, G.; *et al.* Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992; 30(1):95-103.
11. Homsí-Branderburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*. 1988; 26 (7): 615-27.
12. Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Prado Franceschi, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22, 339–346.
13. Bischoff, R.; Heintz, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev. Dyn*. 1994; 201(1): 41-54.
14. Grounds, M.D.; White, J.D.; Rosenthal, N.; Bogoyevitch, M.A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem*. 2002; 50:589-610.

15. Dominov, J.A.; Dunn, J.J.; Miller, J.B. Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *Cell Biol.* 1998; 142: 537-544.
16. Dogra, C.; Hall, S.L.; Wedhas, N.; Linkhart, T.A.; Kumar, A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282: 1-16.
17. Lassar, A.B.; Skapek, S.X.; Novitch, B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol.*1994; 6:788–794.
18. Olson, E.N.; Perry, M.; Schulz, R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol.*1995; 172:2–14.
19. Megeney LA.; Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcriptional factors. *Biochem. Cell Biol.* 73(9-10): 723-32, 1995.
20. Schumalbruch H.; Lewis D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve* 23: 617-626, 2000
21. Ishido M; Kami K; Masuhara M. In vivo expression pattern of MyoD, p21 and Rb protein in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 287, C404-C493, 2004.
22. Yaffe, D; Saxel, D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977; 270:725-7.
23. Lee, M.H.; Jang, M.H.; Kim, E.K.; Han, S.W.; Cho, S.Y.; Kim, C.J. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97(3):369-76.
24. Hawgood, B.J., Pioneers of antivenomous sorotherapy; Dr Vital Brazil (1865-1950) *Toxicon.*30-5-6 (1992) 537-9.
25. Georges, B.; Galland, S.; Rigault, C.; Le Borgne, F.; Demarquoy, J. Beneficial effects of L-carnitine in myoblastic C2C12 cells. Interaction with zidovudine. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65: 1483-1488.
26. Silva LMG, 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 2016. *PLoS One.* 8;11(4):e0152890.
- 27 Franco AT, Silva LM, Costa MS, Zamuner SF, Vieira RP, Teixeira CFP, Zamuner SR. Effect of photobiomodulation on endothelial cell exposed to Bothrops jararaca venom. 2016. *Lasers Med Sci.* 31(5):1017-1025.
28. Macedo AB, Moraes LH, Mizobuti DS, Fogaça AR, Moraes Fdos S, Hermes Tde A, Pertille A, Minatel E. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. 2015. *PLoS One.* 17;10(6):e0128567.

29. Ferraresi, C., Kaippert, B., Avci, P., Huang, Y.Y., Sousa, M.V.P., Bagnato V.S., Parizotto, N.A., e Hamblin, M. R..A terapia a laser de baixa intensidade (luz) aumenta o potencial da membrana mitocondrial e a síntese de ATP nos miotubos C2C12 com um pico de resposta em 3-6 horas. *Photochem photobiol*, marc de 2015, 91 (2):411-416
30. Houreld NN, Masha RT, Abrahamse H. A irradiação com laser de baixa intensidade a 660 nm estimula o citocromo c oxidase em células de fibroblastos estressadas. *Lasers Surg Med*. 2012
31. Dourado, D. M.; Baranauskas, V.; Cruz-Hofling, M. A. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by bothrops moojeni snake venom. *Lasers surg. med.*, 2003; 33: 352-357.
32. Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B; Guimarães-Souza, L.; Ribeiro, W.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2008; 1;51(7):1236-44.
33. Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B.; Sousa, L.G.; Munin, E.; Fernandez, C.M.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(4):591-7.
34. 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*. 2012; 27(1):65-70.
35. 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. 2003. *Lasers surg. med*. 33: 352-357.
36. Doin-Silva, 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. 2009. *Photochem Photobiol*. 85(1):63-69.
37. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. 2008. *Toxicon*. 1;51(7):1236-1244.
38. Uchoa, L.R.D.A.; Dantas, M.E.; Lucena, K.C.R.; Catão, M.H.C.V.; Granville-Garcia, A.F.; Carvalho, N.L.G. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An. Bras. Dermatol*. 2010; 85(6): 849-855.
39. 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. 2016. *PLoS Negl Trop Dis*. 17;10(10):e 0004998.
40. Silva CAA, Silva LMG, Rocha CR, Oliveira LVF, Mesquita-Ferrari RA, Cogo JC, Zamuner SR. Myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* snake venom on C2C12 muscle cells. 2012. *Clin Exp Med Lett*, 53(1-2): 7-10.

41. Bagcchi S. Experts call for snakebite to be re-established as a neglected tropical disease. *BMJ*. 2015; 351: h5313.
42. Organization WH. Neglected tropical diseases 2017 [Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/].
43. Sgrignolli LR, Mendes GEF, Carlos CP, Brundmann EA. Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom. *Nephron Clin. Pract.* 2011; 119:131–13.
44. Milani Junior 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 jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State. Brazil. *QJM*. 1997; 90(5): 323-334.
45. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*. 2002; 115:1461–1469
46. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995; 33: 1405-1424.
47. Lomonte B, Ângulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, Daniele JJ, Geoghegan P, Gutiérrez JM. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon*. 1999; 37, 145-158.
48. Nakano, J.; Kataoka, H.; Sakamoto, J.; Origuchi, T.; Okita, M; Yoshimura, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol*. 2009; 94(9):1005-15.
49. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17:307-13.
50. dos Santos JI, Cintra-Francischinelli M, Borges RJ, Fernandes CA, Pizzo P, Cintra AC, Braz AS, Soares AM, Fontes MR. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. *Proteins*. 2010; 79(1), 61-78.
51. Collares-Buzato CB, LE Sueur LP, Cruz-Höfling MA. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by Bothrops moojeni Snake Venom in Cultured Renal Tubular Epithelia *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2002; 181, 124–132.
52. Villalobos JC, Mora R, Lomonte B, Gutiérrez JM, Ângulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for Extra cellular calcium. *Tox. In Vitro*. 2007; 21: 1382-1389.

53. Ishido M; Kami K; Masuhara M. In vivo expression pattern of MyoD, p21 and Rb protein in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 2004; 287, C404-C493.
54. Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Y Dong, Liu TC. Efeito do laser de baixa intensidade na ROS homeostase e expressão de IGF-1 e TGF-beta 1 na musculature esquelética durante o processo de reparação. *Lasers Med Sci.* 2013; 28: 725-734.
55. Leal Junior EC, Lopes –Martins RA, de Almeida P, Ramos L, Iversen VV, Bjordal JM Effect of low-level laser therapy (GaAs 904nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 108: 1083-1088.
56. Flohe, L.; W. A. Gumzler. Assays of glutathione peroxidase methods in *Enzymology*. V.105; p.114-121. 1984
57. Beutler. E.; O. Duron.; B.M. Kelly. Improved method for the determination of blood glutathione. *The journal of Laboratory and Clinical Medicine.* V.61,p.882- 90.1983.
58. Boveris. In *methods Enzymology*. Vol.105. Packer L. Editor, pp.429-435. Academic Press. New York. 1984.
59. Hermes- Lima, M; W.G. Willmore; K.B.Storey. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based of Fe (III) Xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine.* Vol. 19. N. 3, p. 271-280. 1995.
60. PICK, E; Keisary, Y.A.; Simple colorimetric Method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J immunol. Methods.* Amsterdam; v.38, n.112; p.161-170, June 1980.
61. Urish KL, Vella JB, Okada M, Deasy BM, Tobita K, Keller BB, Cao B, Piganelli JD, Huard J. Antioxidant levels represent a major determinant in the regenerative capacity of muscle stem Cells. *Mol. Biol. Cell.* 2009; 20: 509–520.
62. Zhang YY, Wu JW, Wang ZX. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 3-mediated cross-talk between MAPKs ERK2 and p38alpha. *J Biol Chem.* 2011; 6;286(18):16150-62.
63. Gois PHF, Martines MS, Ferreira D, Volpini R, Canale D, Malaque C, Crajoinas R, Girarad ACC, Massola-Shimiu MH, Seguro AC. Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(11):e0006024.
64. Dimchev DA, Al-Shanti N, Stewart CE. Phospho-tyrosine phosphatase inhibitor Bpv(Hopic) enhances C2C12 myoblast migration in vitro. Requirement of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *J Muscle Res Cell Motil.* 2013; 34, 125–136.
65. Xiong Q, Chai J, Zhang PP, Wu J, Jiang SW, Zheng R, Deng CY. MyoD control of SKIP expression during pig skeletal muscle development. *Mol Biol Rep.* 2011;38:267–274.

66. Yeo S, Jeong S, Kim J, Han JS, Han YM, Kang YK. Characterization of DNA methylation change in stem cell marker genes during differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359:536–542.
67. Caliaro F, Maccatrozzo L, Toniolo L, Reggiani C, Mascarello F, Patrino M. Myogenic regulatory factors expressed during postnatal hyperplastic growth in porcine muscles. *Basic Appl Myol.* 2005; 15:55–60.
68. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993; 75:1241–1244.
69. Abe S, Rhee S, Iwanuma O, Hiroki E, Yanagisawa N, Sakiyama K, Ide Y. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and **MRF4** in proliferated myoblasts. *Anat Histol Embryol.* 2009 Aug; 38 (4):305-10
70. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, Morgan JE, Zammit PS. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS one.* 2009; 4:e4475.
71. Morais SR, Goya AG, Urias Ú, Jannig PR, Bacurau AV, Mello WG, Faleiros PL, Oliveira SH, Garcia VG, Ervolino E, Brum PC, Dornelles RC. Strength training prior to muscle injury potentiates low-level laser therapy (LLLT)-induced muscle regeneration. *Lasers Med Sci.* 2017; Feb;32 (2):317-325.
72. 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.
73. Young S, Dyson RM, and Bolton P. Effect of light on calcium uptake by macrophages.. *Laser Ther.* 1990; 2, 53-57.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Zamuner SR, Teixeira CF. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm.* 2002 Dec;11(6):351-7.
78. Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, Teixeira CFP. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon.* 2005 Dec 1;46(7):806-13.
79. Setubal Sda S, Pontes AS, Nery NM, Bastos JS, Castro OB, Pires WL, Zaqueo KD, Calderon Lde A, Stábeli RG, Soares AM, Zuliani JP. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. *Toxicon.* 2013 Dec 15;76:143-9.

- 80.** Stuqui B, de Paula-Silva M, Carlos CP, Ullah A, Arni RK, Gil CD, Oliani SM. Ac2-26 Mimetic Peptide of Annexin A1 Inhibits Local and Systemic Inflammatory Processes Induced by Bothrops moojeni Venom and the Lys-49 Phospholipase A2 in a Rat Model. PLoS One. 2015;10(7):e0130803.
- 81.** Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, Borges da Silva H, Fernandes CM, D'Império Lima MR, et al. Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. Toxicon. 2012;60(1):12-20.
- 82.** Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol. 2011;29:71-109.
- 83.** Sachetto ATA, Rosa JG, Santoro ML. Rutin (quercetin-3-rutinoside) modulates the hemostatic disturbances and redox imbalance induced by *Bothrops jararaca* snake venom in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Oct 11;12(10):e0006774.
- 84.** Zamuner SR, Gutierrez JM, Muscará MN, Teixeira AS, Teixeira CF. Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. Toxicon. 2001 Oct;39(10):1505-13.
- 85.** Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Sundaram MS, Kemparaju K, Girish KS.. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. Toxicon. 2015 May;98:89-97.
- 86.** Urish KL, Vella JB, Okada M, Deasy BM, Tobita K, Keller BB, Cao B, Piganelli JD, Huard J. Antioxidant levels represent a major determinant in the regenerative capacity of muscle stem Cells. Mol. Biol. Cell. 2009; 20: 509–520.
- 87.** Zhang YY, Wu JW, Wang ZX. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 3-mediated cross-talk between MAPKs ERK2 and p38alpha. J Biol Chem. 2011 May 6;286(18):16150-62.
- 88.** Kurosaka M, Machida S (2013) Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK2/STAT3 signaling pathway through cyclin D1 targeting. Cell Prolif 46:365.
- 89.** Gaynor, A. S., Tzu-Huai, L., Amy E. S., Wynand, V.d. G. V.N., Lukas, J. N. Hillary, K.G., Dana, M.B.B., Zuchner, S., Freeman, M.R. Glutathione S-Transferase regula populações mitocondriais nos axônios através do aumento da oxidação da glutathione, Neuron 2019 3 de julho; 103 (1): 52–65.e6.
- 90.** Fazendeiro T., Reinecke, J.B., Xie, S., Bahl, K., Naslavsky, N., Caplan, S., Controle da homeostase mitocondrial por proteínas reguladoras endocíticas [J Cell Sci.](#) 15 de julho de 2017; 130 (14): 2359-2370. doi: 10.1242 / jcs.204537. Epub 2017 8 de junho
- 91.** Smith GA et al. A Glutathione S-Transferase regula as populações mitocondriais nos axônios através do aumento da oxidação da glutathione. Neuron **103** : 52-65.e6 (2019)

- 92** Choi JJ, Choi J, Kang CD, Chen X, Wu CF, et al. (2007) O peróxido de hidrogênio induz a morte de astrócitos através da regulação negativa da atividade do fator nuclear constitutivo kappaB . *Free Radic Res* 41 : 555–562p
- 93.** Lee, H.A., Lee, E., G.Y, Lua, E.K., Quan, F.S., Kim, I.O inibidor de histona desacetilase MGCD0103 protege o pâncreas do estresse oxidativo induzido pela estreptozotocina e da morte das células β . *Pharmacother Biomed.* 2019 Jan; 109: 921-929. doi: 10.1016 / j.biopha.2018.10.163. Epub 2018 5 de novembro
- 94.** Ferraresi C., Kaippert B., Avci P., Huang YY. De Sousa MV, Bagnato VS, Bagnato VS, Parizotto N.A., Hamblin M.R., Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol.* 2015 Mar-Apr;91(2):411-6
- 95.** Baldwin ASJ., The NF-kB and IKb proteins new discoveries and insights. *Annu Rev. Immunol.* 1996, 14: 649-83.
- 96.** Glezer I, Marcourakes T., Avellar M.C.W., gorenstein C., Savone C., The role of the transcription factor NF-Kb in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2000,22 (1): 26-30.
- 97.** Pontes AS., Setubal, Sda S., Nery NM. Silva FS., Silva Sda., Fernande C., Fernandes CFC., Stabeli RG., Soares AM., Zuliani PZ. The mapkp38 is involved in the chemotaxis of human neutrophils induced by the L-amino acid oxidase of the *Rodostoma* of *Calloselma*. *Toxicon*, 119.106-16 (2016)