

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

ADRIANO SILVIO DOS SANTOS

**EFEITO DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) SOBRE LESÕES CAUSADAS
POR VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS EM CÉLULAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS C2C12.**

SÃO PAULO - SP

2018

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU

ADRIANO SILVIO DOS SANTOS

**EFEITO DE DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) SOBRE LESÕES CAUSADAS
POR VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS EM CÉLULAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS C2C12.**

TESE APRESENTADA À
UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO,
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM BIOFOTÔNICA.

PÓS-GRADUANDO: ADRIANO SILVIO DOS SANTOS
ORIENTADORA: DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

SÃO PAULO - SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Adriano Silvio dos.

Efeito do Diodo Emissor de Luz (LED) sobre lesões causadas por veneno de serpentes do gênero *Bothrops* em células musculares esqueléticas C2C12. / Adriano Silvio dos Santos. 2018.

85 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

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

1. *Bothrops jararacussu*. 2. *Bothrops moojeni*. 3. Envenenamento.
4. LED. 5. Célula muscular. 6. Integridade e viabilidade

I. Zamuner, Stella Regina.

II. Título.

CDU 615.831

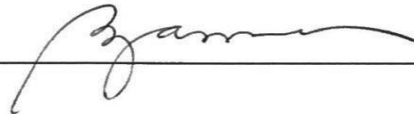
São Paulo, 12 de março de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

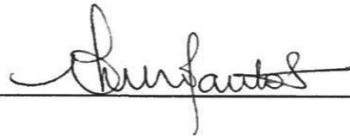
Aluno (a): Adriano Silvio Santos

Título da Tese: "Efeito do diodo emissor de luz (LED) sobre a miotoxicidade causadas por veneno de serpentes do gênero *Bothrops* em células musculares esqueléticas C2C12

Presidente: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



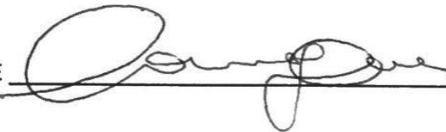
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a. MARICILIA SILVA COSTA



Membro: PROF^a. DR^a. CAMILA SQUARZONI DALE



“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo aos meus pais e minha família que sempre me apoiaram e me incentivaram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e coragem que precisei para percorrer esta caminhada.

Aos meus amados pais Maria Cleonice Ramos da Silva Santos e Joaquim Pereira dos Santos (in memórian) e toda a minha família que sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram com palavras de incentivo e acreditaram no meu crescimento.

Ao meu esposo Jhonny, pela paciência, compreensão, carinho e por toda a ajuda durante este tempo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Stella Zamuner que acreditou no meu trabalho, me acolheu com muito carinho e respeito, sendo sempre paciente dedicada e disposta a me ensinar cada vez mais, se tornando um exemplo de profissional.

A meu professor de graduação Joelmir Lucena Veiga, que participou do meu crescimento acadêmico.

A todos meus colegas de laboratório em especial Adilson, Gabriela, Lucas, Regiane, Mozânia, Otávio, Fábio, Zé, Marcelo, que sempre estiveram ao meu lado.

À técnica de laboratório Karen, que sempre esteve disposta a me ouvir nas horas difíceis.

À Prof^a Silvia Zamuner que esteve sempre disposta a colaborar para a realização deste trabalho e ao Prof^o Stephen Hyslop pela doação das toxinas e Prof^o Ernesto Belizário pela doação das células C2C12.

Aos professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica e Medicina.

À PROSUP/CAPES, pela bolsa de estudos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	18
Figura 2: Serpente <i>Bothrops moojeni</i>	19
Figura 3: Aparelho Diodo Emissor de Luz (LED)	23
Figura 4: Efeito do Diodo Emissor de Luz (LED) na integridade da monocamada de células musculares C2C12 após incubação com veneno de <i>B. jararacussu</i>	32
Figura 5: Efeito do Diodo Emissor de Luz (LED) integridade da monocamada de células musculares C2C12 após incubação com veneno de <i>B. moojeni</i>	34
Figura 6: Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>B. jararacussu</i>	36
Figura 7: Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>Bothrops moojeni</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais e aplicabilidade	26
Tabela 1: Parâmetros do LED	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ATP – Adenosina trifosfato

BthTX - I – Bothropstoxina I

BthTX - II – Bothropstoxina II

cm² – Centímetro quadrado

CS – Célula satélite

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FLA₂ – Fosfolipases A₂

FRM – Fatores regulatórios miogênicos

J – Joules

J/cm² – Joules por centímetro ao quadrado

L- litro

LBI – Laser de baixa intensidade

LED - Light Emitting Diode

mg - miligrama

mL – mililitros

MTT - (Brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol)

MRF4 – Fator regulatório miogênico 4

MyoD – Proteína 1 de diferenciação miogênica

nm – nanômetros

PBS – NaCl 140mM; KCL 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4

FLA₂ – Fosfolipases A₂

rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

TLBP – Terapia Laser de Baixa Potência

VBj – Veneno da serpente *B. jararacussu*

VBm – Veneno da serpente *B. moojeni*

μL – microlitros

λ – Comprimento de onda

Sumário

1.	Introdução	15
	1.1 Considerações gerais sobre o músculo esquelético	16
	1.2 <i>Bothrops jararacussu</i>	17
	1.3 <i>Bothrops moojeni</i>	18
	1.4 Soroterapia	19
	1.5 Fotobiomodulação	20
	1.5.1 Terapia com Laser de baixa intensidade	20
	1.6 Light Emitting Diode (LED)	21
	1.7 Fotobiomodulação e acidente ofídico	23
2.	Justificativa	24
3.	Objetivo	25
	3.1 Objetivo geral	25
	3.2 Objetivo específico	25
4.	Materiais e Métodos	26
	4.1 Veneno de serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjs).....	26
	4.2 Veneno de serpente <i>Bothrops moojeni</i> (VBm)	26
	4.3 Células C2C12 musculares	26
	4.4 Cultivo Celular	26
	4.5 Condições de tratamento.....	26
	4.6 Irradiação Diodo Emissor de Luz (LED).....	28
	4.7 Ensaio para a avaliação da integridade da monocamada de células C2C12	29
	4.8 Ensaio para a avaliação da viabilidade células musculares.....	30
	4.9 Análise Estatística	30
5.	Resultados	31
	5.1 Efeito do LED na integridade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>B. jararacussu</i>	31

5.2 Efeito do LED na integridade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>B. moojeni</i>	33
5.3 Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>B. jararacussu</i>	35
5.4 Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno <i>B. moojeni</i>	37
6. Discussão	39
7. Conclusão	43
8. Bibliografias	44
9. Apêndice	59

Resumo

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops*, induz a uma reação inflamatória local intensa, caracterizada por dor, formação de edema e migração leucocitária, esse processo pode levar à necrose tecidual do membro afetado. A utilização do soro antibotrópico desempenha a função de neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, diminuindo danos sistêmicos, porém sua ação não se estende as manifestações locais. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do LED em células musculares C2C12 submetidas à lesão pelo veneno das serpentes *B. jararacussu* e *B. moojeni* quanto a: integridade e viabilidade celular. Após o período de incubação as células receberam o veneno das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, nas concentrações de 5, 10, 12,5, 25,50 e 75 µg/mL e foram imediatamente irradiadas com LED, no comprimento de onda (λ) de 636nm, a densidade de energia 4J/cm², potência 160 mW, energia total 11.2J, tempo de irradiação 70 segundo por contado e incubadas por 30, 60 e 120 min. Os resultados demonstraram que os veneno das serpentes *B. jararacussu* e *B. moojeni* afetaram a integridade das células de forma dose-tempo dependente. O LED foi capaz de proteger a integridade celular frente ao veneno de *B. jararacussu* aos 120 min nas concentrações de 5, 10, 12,5, 25 e 50 µg/mL. O mesmo efeito protetor foi observado em 60 minutos nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 75 µg/mL e aos 120 minutos na concentração de 25 µg/mL após adição do veneno *B. moojeni*. O veneno de *B. jararacussu* diminuiu a viabilidade celular em todos os tempos analisados. O LED não foi capaz de reverter os efeitos do veneno aos 30 e 120 min, porém em 60 min apresentou aumento significativo na viabilidade celular nas concentrações de 50 e 75 µg/mL. O veneno de *B. moojeni* foi capaz de diminuir a viabilidade celular em todas as concentrações e tempos estabelecidos. O LED não foi capaz de reverter esse quadro nos tempos de 30 e 60 min, mas aos 120 min o LED foi capaz de aumentar a viabilidade celular na concentração de 50 µg/mL. Portanto, estes resultados obtidos sugerem que o LED protege contra a ação do veneno na integridade celular.

Palavras chaves: *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, envenenamento, LED, célula muscular, integridade, viabilidade.

Abstract

The venom of the snakes of the *Bothrops* genus, induces an intense local inflammatory reaction, characterized by pain, edema and leukocyte migration, this process can result in tissue necrosis of the affected limb. The use of antivenom serum has the function to neutralize a greater amount of circulating venom as possible, reducing systemic effects, but its action does not extend to local manifestations. The objective of this work was to analyze the effect of LED on C2C12 muscle cells submitted to injury by venom of snakes *B. jararacussu* and *B. moojeni* regarding cell integrity and viability. After the incubation period, the cells received the venom of *Bothrops jararacussu* snakes and *Bothrops moojeni*, at concentrations of 5, 10, 12.5, 25.50 and 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and were immediately irradiated with LEDs, at the wavelength (λ) of 636nm, energy density 4J / cm^2 , potency 160 mW, total energy 11.2J, irradiation time 70 seconds and incubated for 30, 60 and 120 min. The results showed that venom of *B. jararacussu* and *B. moojeni* snakes affected the integrity of the cells in a dose-time dependent manner. The LED was able to protect the cellular integrity against the venom of *B. jararacussu* at 120 min at concentrations of 5, 10, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The same protective effect was observed in 60 minutes at concentrations of 12.5, 25, 50 and 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and at 120 minutes at 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ after addition of *B. moojeni* venom. The venom of *B. jararacussu* decreased cell viability at all times analyzed. The LED was not able to revert the effects of venom at 30 and 120 min, but in 60 min showed a significant increase in cell viability at concentrations of 50 and 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$. *B. moojeni* venom was able to decrease cell viability at all concentrations and times established. The LED was not able to revert this frame at the 30 and 60 min times, but at 120 min the LED was able to increase cell viability at the concentration of 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Therefore, these results suggest that the LED protects against cellular integrity.

Keywords: *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, poisoning, LED, muscle cell, integrity, viability.

1. INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse na descoberta de tratamentos alternativos para acidentes botrópicos. As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos na América Latina pertencem ao gênero *Bothrops* e *Bothropoides*, da família Viperidae, ⁽¹⁾ e dessa forma, esse gênero constitui o grupo mais importante, com mais de 60 espécies em todo o território e pode ser encontrada em diversos ambientes. Com base em registros das ocorrências anuais, as serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, ^(1,2) sendo também consideradas as mais agressivas ⁽³⁾. 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 ⁽⁴⁾.

Os venenos ofídicos constituem uma mistura complexa de proteínas e outros compostos, com as mais diversas propriedades biológicas. Acredita-se que os efeitos do veneno ofídico seja uma somatória dos efeitos isolados dos vários componentes, com atividades biológicas distintas ou sinérgicas ⁽⁵⁻⁷⁾. O envenenamento pela gênero *Bothrops* e *Bothropoides* ocasionado por sua picada leva a manifestações sistêmicas caracterizadas por náuseas, vômitos, sudorese, hemorragia, hipotensão arterial, insuficiência renal e raramente choque, além de manifestações locais como dor, edema de instalação precoce e caráter progressivo, equimoses, hemorragia, hipóxia, podendo ser acompanhada por necrose tecidual ^(4,8,9,10). Essas manifestações podem estar associadas à infecção

no local da picada devido a possível presença de flora bacteriana na cavidade oral e/ou no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e *bothropoides* que são inoculados no momento da picada ⁽¹¹⁾.

Uma proporção significativa dos acidentes ofídicos compromete de forma impactante os aspectos socioeconômicos e psicológicos do indivíduo afetado ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

1.1 Considerações gerais sobre o envenenamento e o músculo esquelético

A mionecrose local é uma importante modificação nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*. A literatura mostra que a mionecrose é causada por uma família de proteínas denominadas miotoxinas, elementos encontrados nos venenos botrópicos, as quais apresentam características de fosfolipases A2 (PLA2) e agem diretamente sobre a membrana da célula muscular, por formarem ligações e alterarem a membrana plasmática ^(15,16). A miotoxicidade pode, ainda, ser consequência da isquemia dos vasos da microcirculação e de artérias intramusculares ^(15,17).

Nos episódios de lesão muscular, o processo de formação do novo tecido demanda que células precursoras mononucleadas quiescentes (células satélites) sejam ativadas, tornam-se mioblastos, esses se proliferam e se diferenciam em miotubos para se incorporar às fibras lesionadas ou formar uma nova fibra muscular funcional, para assim restaurar as miofibrilas danificadas ^(18,19,20,21).

O reparo muscular é semelhante ao processo de miogênese, esse é regulado por fatores de transcrição miogênica básica, tais como MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 conhecidos como fatores regulatórios miogênicos (MRFs) e fator excitador miócito 2 (MEF2) que ajustam a expressão de vários genes

músculo-específicos, como a miosina de cadeia pesada (MHC) e creatina quinase (22,23,24).

A célula muscular de linhagem C2C12 é um subclone da linhagem de células musculares C2, isoladas de células-satélites de camundongos (25). Essas células são consideradas um bom modelo para o estudo do crescimento e diferenciação celular, devido apresentar a maioria das características de células musculares normais (26,27). Para mais, o uso de mioblastos/miotubos de músculo esquelético, como alvos para venenos/toxinas das serpentes, tem sido sugerido como um modelo *in vitro* viável para estudar o mecanismo miotóxico(s), uma vez que ele se compara com a miotoxicidade do veneno *in vivo* (28).

1.2 *Bothrops jararacussu*

A serpente *B. jararacussu* (FIG. 1) está distribuída na América do Sul, habitando a mata Atlântica. Essa serpente causa 0,8 a 10% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (29). O envenenamento causado por esta serpente tem grande mortalidade quando comparada com outras serpentes do mesmo gênero (30), sendo que o grande nível de letalidade está atribuído aos 25% de miotoxinas encontrada no veneno (31). Os estudos experimentais mostram que o veneno dessa serpente causa necrose muscular a partir das miotoxinas encontradas no veneno que atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, causando agravos tecidual proeminente (32).

Figura 1: *Bothrops jararacussu*



Fonte: [http:// http://www.biogalapagos.com.br/](http://www.biogalapagos.com.br/)

1.3 *Bothrops moojeni*

A serpente *Bothrops moojeni* (Fig. 2) é uma serpente de grande porte e comportamento agressivo ⁽³³⁾. É a principal serpente responsável por acidentes ofídicos na região centro oeste do Brasil ⁽³⁴⁾, ainda pode ser encontrada distribuída em estados da região sudoeste do Brasil ⁽³⁵⁾. Ademais, serpentes dessa espécie apresentam-se responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos relatados na região de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo ⁽³³⁾.

Quando comparados a complicações causadas com acidentes ofídicos por *Bothrops jararaca*, os sinais clínicos causados por *Bothrops moojeni*, se mostram mais graves e com maior número de complicações ⁽³⁶⁾.

Figura 2: *Bothrops moojeni*



Fonte: http://lancehead.philodryas.com/galerie_moojeni.html

1.4 Soroterapia

O tratamento utilizado para o acidente botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico. Devido à efetividade dos antivenenos, os coeficientes de letalidade, resultantes desses acidentes, têm demonstrado tendência decrescente ao longo do tempo. Porém, os efeitos locais são dificilmente neutralizados. Estudos experimentais têm proposto que existe uma significativa, embora parcial, neutralização da hemorragia, edema e mionecrose local apenas quando o antiveneno é administrado rapidamente após o envenenamento ^(37,38). Assim, *Camey et al.* (2002) ⁽³⁹⁾, estudaram o efeito farmacológico do veneno de cinco espécies botrópicas brasileiras em associação à sua letalidade, atividade hemorrágica, necrosante, proteolítica da fosfolipase, coagulante e fibrinolítica. Os resultados apontaram que o antiveneno foi eficaz na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. No entanto, os efeitos locais não foram neutralizados pelo uso de antiveneno e os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, até o momento, não foram demonstrados.

Em se tratando do veneno de *B. moojeni*, o edema é um achado comum que é regularmente seguido de pressão intracompartimental levando a síndrome

compartimental. Essa reação local e a mionecrose não são prevenidas, mesmo quando, uma grande quantidade de antiveneno é administrada 3 horas depois do acidente ⁽⁴⁰⁾.

No Brasil, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia já existente, com o propósito de reduzir a miotoxicidade local, como terapias que combinam o uso da soroterapia à aplicação de extratos de plantas medicinais ^(41,42,43,44) e substâncias como heparina e poliânions ⁽⁴⁵⁾. No entanto, qualquer que seja o tratamento terapêutico até hoje disponível, este tem se mostrado ineficaz na neutralização dos efeitos locais causados pelo veneno botrópico, os quais são de evolução rápida e intensa. Por esses motivos a procura pôr tratamentos alternativos aos usualmente aplicados tem sido motivo de interesse e se constituem em medidas extremamente importantes para neutralização e/ou diminuição dos efeitos degenerativos, bem como a aceleração do processo regenerativo. Outra possibilidade que começa a ser investigada é a utilização de laser terapia.

1.5 Fotobiomodulação

1.5.1 Laser de baixa intensidade

A palavra laser significa *-Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, ampliação da luz por emissão estimulada de radiação. A laser terapia vem sendo muito utilizada nas últimas décadas, inclusive nas áreas médicas e paramédicas, iniciando a ação ou a estimulação bioquímica, fisiológica ou atividade proliferativa das células e tecidos.

Geralmente a extensão da interação entre lasers e os tecidos é determinado pelo comprimento de onda de luz laser, pelas características ópticas de cada tecido, pela densidade de potência (irradiância), energia total entregue sobre a área da superfície irradiada (densidade de energia), duração da exposição e o modo de entrega da energia para o tecido alvo ^(46,47,48).

A luz laser ao incidir em um meio, pode ser refletida, espalhada, transmitida ou absorvida. O laser fornece uma quantidade elevada de fótons que em parte

são: refletidos, dispersos e transmitidos ao atingir o tecido biológico e o restante é absorvido em diferentes camadas da epiderme e da derme, de acordo com os constituintes de cada camada. Para que a radiação laser produza um efeito terapêutico no corpo humano, é necessário que ela seja absorvida para que ocorra a interação com as estruturas moleculares e celulares ^(49,50,51).

A aplicação do laser de baixa intensidade (LBI) têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual. Assim, esses lasers são reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e anti-inflamatória sobre tecidos duros e moles produzido por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ao invés de efeitos térmicos ^(49,52). O LBI age principalmente sobre as organelas celulares (mitocôndrias e membranas), ocasionando aumento de ATP (Trifosfato de Adenosina) e alternado o transporte iônico. Acredita-se que existam fotorreceptores sensíveis a determinados comprimentos de ondas, que ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Deste modo o LBI acelera, em curto prazo, a síntese do ATP (glicose e oxidação fosforilativa) e em longo prazo a transcrição do DNA ⁽⁵³⁾ e ainda, colabora com a produção de ácido araquidônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, justificando sua ação antiedematosa e anti-inflamatória ⁽⁵⁴⁾, promove aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando o efeito analgésico na dor não inflamatória ⁽⁵⁵⁾.

Apesar de existir um grande número de trabalhos mostrando os efeitos do LBI sobre as células e tecidos, é importante salientar que as informações sobre o mecanismo de ação do laser sobre os tecidos biológicos, ainda não são conclusivas, portanto mais estudos acerca do tema se faz necessário.

1.6 Light Emitting Diode(LED)

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

dispositivos semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal, conduzir a corrente elétrica em um único sentido ⁽⁵⁶⁾. Quando polarizados adequadamente esses dispositivos semicondutores emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes ⁽⁵⁷⁾. O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica é denominado “eletroluminescência”. A luz emitida se dá devido ao diodo energizado ⁽⁵⁸⁾. Segundo alguns autores, a terapia com o LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a TLBP (terapia a laser de baixa potência), pois, o aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, tem sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz ⁽⁵⁹⁾. O processo de absorção luminosa por cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir um pacote energético específico para que promova reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras ⁽⁵⁹⁾.

Os LEDs podem ser usados na Fisioterapia (dores musculares crônicas e agudas), na Odontologia (tecidos inflamados, ulcerações, entre outros), na Dermatologia (redução de edemas, úlcera e dermatites), e muitas outras especialidades ⁽⁶⁰⁾. São aplicados diretamente na área lesada ou em vários pontos do corpo.

Atualmente, os LEDs estão surgindo como uma fonte de luz alternativa na fotobioestimulação aplicada à redução de edemas e tecidos inflamatórios. A utilização da radiação LED permite uma redução significativa no custo do tratamento quando comparado ao tratamento com a terapia com laser.

1.7 Fotobiomodulação e acidente ofídico

A literatura apresenta poucos trabalhos sobre os efeitos do LBI para o tratamento do efeito local causado por veneno ofídico. Dourado, *et al.* (2003) ⁽⁶¹⁾, estudaram o efeito da irradiação laser em mionecrose, no músculo gastrocnêmio de camundongos, causado pela injeção intramuscular de veneno de serpente *B. moojeni*. Esses autores observaram que o tratamento com esse laser diminuiu consideravelmente a mionecrose, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana plasmática. Estudos realizados por nosso grupo demonstram que o tratamento com o laser e LED aplicados 30 min e 3 h após a injeção do veneno de *B. moojeni* e por duas miotoxinas isoladas deste veneno foram efetivos na redução do edema e hemorragia ⁽⁶²⁾. Ademais, outros estudos realizados por nosso grupo demonstram que o LBI reduz o edema causado pelo veneno de *B. jararacussu* em modelo de inflamação muscular. Além disso, o tratamento conjunto do laser com o antiveneno botrópico potencializa o efeito observado com o laser por si só, reduzindo o efeito edematogênico do veneno de *B. jararacussu* ⁽⁶³⁾. Ainda, demonstramos que o LBI, além de inibir o edema e a migração de leucócitos, também reduziu a alodínia e a hiperalgesia causada pelo veneno de *B. jararacussu* ⁽⁶⁴⁾. Esses resultados sugerem que a fotobioestimulação possa ser uma alternativa a mais para o tratamento de acidentes com serpentes botrópicas.

2. Justificativa

A mionecrose local, assim como a hemorragia, são consequências comuns nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, que dependendo da extensão, pode determinar a perda do membro afetado. A soroterapia, que é o tratamento utilizado no caso de acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, é ineficaz em neutralizar os efeitos locais causados por esses venenos. Assim, evidencia-se a importância da procura de terapias coadjuvantes à soroterapia na evolução do quadro local.

Não existem dados na literatura a respeito dos mecanismos da fototerapia com Diodos emissores de luz (LED) envolvidos na resposta intracelular de células musculares C2C12 submetidos à lesão por veneno de serpente do gênero *Bothrops*. Assim, o uso dessa terapia em células isoladas pode vir a esclarecer o mecanismo de ação da fototerapia em lesões locais e ainda promover o desenvolvimento de novas estratégias para tratar os graves efeitos causados pelo envenenamento botrópico. Para este estudo foram utilizados mioblastos de linhagem C2C12, para avaliar os efeitos dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. A utilização de músculos esqueléticos mioblastos/miotubos como alvos para o veneno bruto de serpente, bem como suas substâncias isoladas como metaloproteinase e miotoxinas tem sido sugerida como uma alternativa viável no modelo *in vitro* para estudar mecanismos miotóxicos, uma vez que se correlaciona com miotoxicidade *in vivo*.

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar a eficácia terapêutica de um sistema de fototerapia que utiliza diodos emissores de luz (LED) em células musculares esqueléticas após lesão por veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

3.2 Específicos

Avaliar, através de ensaios *in vitro*, os efeitos da irradiação LED sobre células musculares, após lesão com o veneno de serpentes *Bothrops*, quanto:

- I- Integridade celular por técnica de Cristal violeta
- II- Viabilidade celular por técnica de MTT

4. Materiais e Métodos

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

4.1 Veneno de serpente *Bothrops jararacussu* (VBjs): Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes VBj, provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba, gentilmente doados pelo prof. Dr. José Carlos Cogo. Os venenos foram reunidos em um mesmo tubo, homogeneizados, submetidos a liofilização e mantidos a -20°C até o momento de sua utilização.

4.2 Veneno de serpente *Bothrops moojeni* (VBm): Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes VBm, provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba, gentilmente doados pelo prof. Dr. José Carlos Cogo. Os venenos foram reunidos em um mesmo tubo, homogeneizados, submetidos a liofilização e mantidos a -20°C até o momento de sua utilização.

4.3 Células C2C12 musculares: Foram utilizadas células, provenientes da linhagem de mioblastos C2C12, obtidas no banco de células do laboratório de pesquisa da Universidade Nove de Julho - UNINOVE. As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab).

4.4 Cultivo Celular: As células musculares C2C12 foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C , numa atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O monitoramento do crescimento

celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada dessas células se tornou subconflente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, sobrenadante foram 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 nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil), e resuspendidas em 1ml 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%.

4.5 Condições de tratamento: Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa. A cultura de células musculares C2C12 foi dividida em cinco grupos, conforme tabela abaixo:

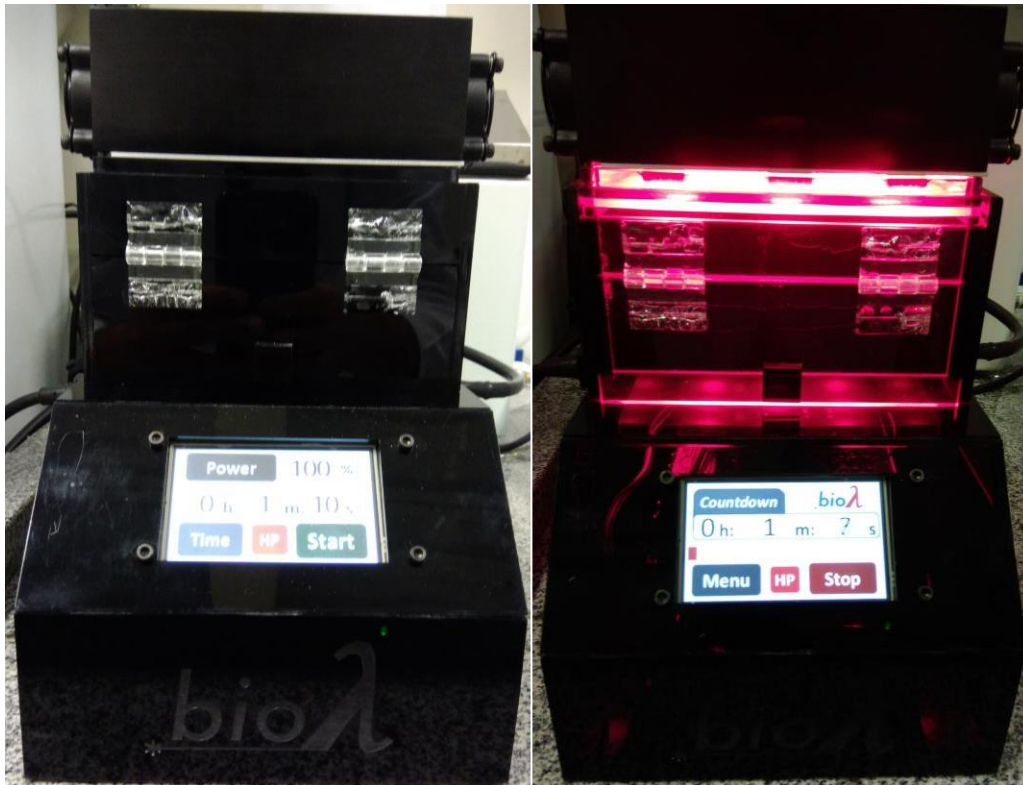
Tabela 01- Grupos experimentais e aplicabilidade

Grupo 1	Controle	Células + meio de cultura DMEM
Grupo 2	Células + Veneno	Células + VBj
Grupo 3	Células + Veneno	Células + VBm
Grupo 4	Veneno + LED	Células + Veneno VBj + LED
Grupo 5	Veneno + LED	Células + Veneno VBm + LED

A cultura foi irradiada imediatamente após a adição dos venenos, de modo a atingir a monocamada de células musculares, conforme a figura 3:

4.6 Irradiação Diodo Emissor de Luz (LED): Aparelho gentilmente cedido pelo professor Dr. Renato Araújo Prates do curso de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada as Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Apresenta-se como Diodo semiconductor que emite luz quando conectado a um circuito elétrico. Luz monocromática dependendo do material semiconductor.

Figura 3: Aparelho Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 2 - Parâmetros do LED

Comprimento de onda [nm]	636,35
Largura de banda espectral (FWHM) [nm]	15,78
Modo Operacional	onda continua
Potência radiante média [mW]	160
Polarização	Aleatória
Abertura de diâmetro [cm]	0,9
Irradiação na abertura [mW/cm ²]	252
Perfil do feixe	Multimodo
Feixe de tamanho de ponto no destino [cm ²]	2.8
Irradiância do destino [mW/cm ²]	56
A duração da exposição [S]	70
Exposição radiante [J/cm ²]	4.0
energia radiante [J]	11.2
Número de pontos irradiados	1
Área irradiada [cm ²]	2.8
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões de tratamento	1
Frequência de sessões de tratamento	11.2
Energia radiante total de [J]	

4.7 Ensaio para a avaliação da integridade da monocamada de células

C2C12: Uma vez formada a monocamada das células, em placa de 96 poços, 1×10^4 cel/poço, as mesmas foram incubadas com os venenos nas concentrações de 5, 10, 12,5, 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$, em meio de cultura (controle), por 30, 60 e 120 minutos. Após cada período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram retirados e as monocamadas lavadas com PBS 1X. Em seguida, foram adicionados aos poços 40 μL de uma solução de cristal violeta (0,5%) em ácido acético (30%). Decorridos 15 minutos, as placas foram lavadas em água corrente e colocadas para secar. A seguir, 100 μL de metanol absoluto (MERCK) foram adicionados em cada poço e a leitura da densidade óptica (D.O.) realizada em leitor de placa a 620 nm. As lesões causadas foram definidas como a porcentagem de diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à

ação dos venenos em relação à monocamada de mioblastos não estimuladas pelos mesmos.

4.8 Ensaio para a avaliação da viabilidade células musculares: O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo método MTT. Após cada período de incubação, o sobrenadante das culturas foi removido e as células foram lavadas 1X com 100 μ L de PBS. Em seguida, adicionado 50 μ l de MTT (brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol) e incubadas por 3 horas a 37°C. Terminado o tempo de incubação foi adicionado 100 μ L de isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com auxílio de um leitor de Elisa (2020, Anthos, Eugendorf, Áustria).

4.9 Análise Estatística: Para a análise dos dados foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) com auxílio do software “GraphPad Prisma-5”. A significância estatística foi verificada pelo teste Tukey e considerada aceitável quando $p \leq 0.05$. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e três experimentos independentes foram realizados.

5. Resultados

5.1 Efeito do LED na integridade de células musculares submetidas à lesão por veneno *B. jararacussu*.

A capacidade do veneno em afetar a integridade das monocamadas das células musculares C2C12 em cultura foi avaliada pelo descolamento das monocamadas, após sua incubação por 30, 60 e 120 minutos, em diferentes concentrações (5, 10, 12,5, 25, 50 e 75 µg/mL) em comparação às monocamadas contendo apenas meio de cultura (controle). Para a avaliação do efeito de LED na integridade das monocamadas de células, o mesmo foi aplicado diretamente nas células C2C12, imediatamente após a adição do veneno. Nossos resultados demonstram que houve diminuição na integridade celular aos 30 e 60 minutos em todas as concentrações do veneno quando comparado com o grupo controle, o LED não foi capaz de proteger as células contra a ação do veneno. Aos 120 minutos houve diminuição na integridade celular em todas as concentrações quando comparados com o grupo controle, o LED foi capaz de proteger as células contra a ação do veneno em 43% na dose de 5 µg, 38% em 10 µg, 25% em 12,5 µg, 15% em 25 µg e 13% em 50µg/mL.

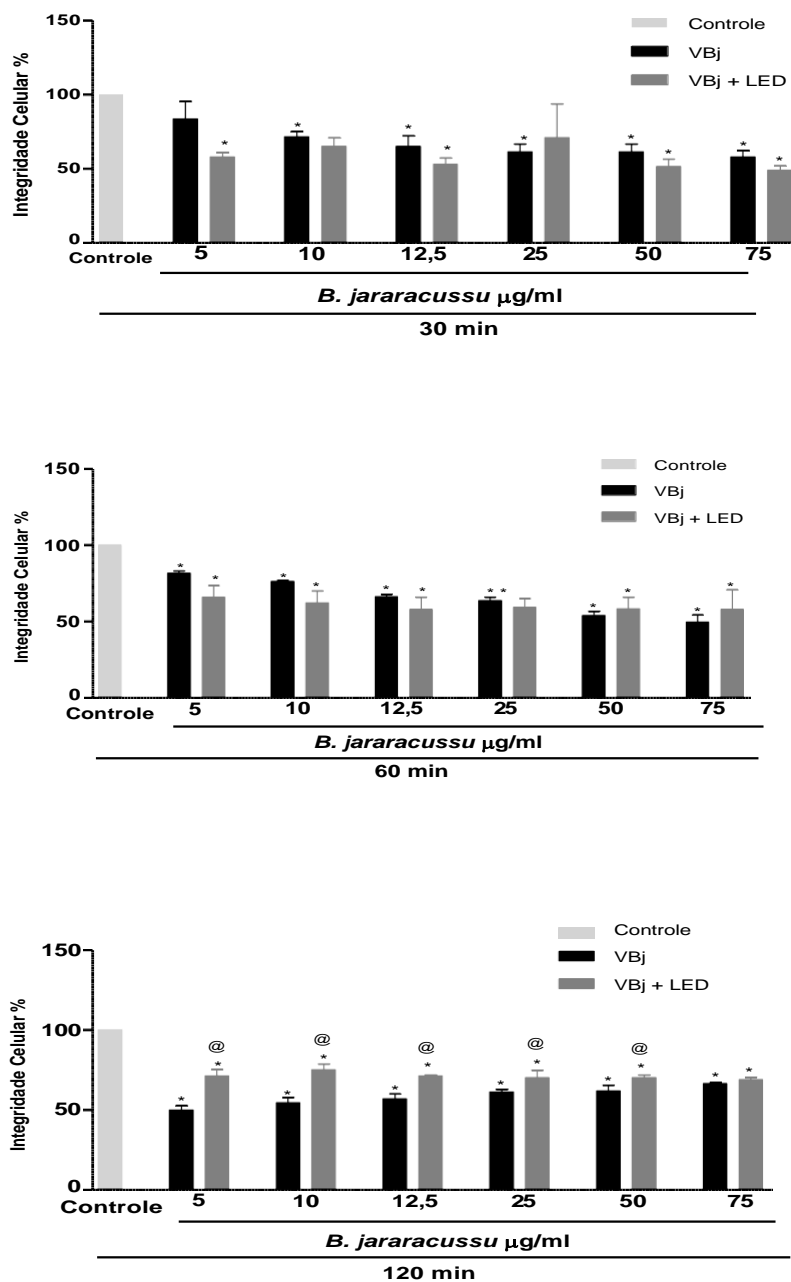


Figura 4 - Efeito do LED na integridade de células musculares C2C12 após incubação com veneno de *B. jararacussu*. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços 1×10^4 e incubadas durante 24 horas para a adesão celular. Após este período o veneno foi adicionado em diferentes concentrações e as células foram imediatamente irradiados com LED logo após foram incubadas durante 30, 60 e 120 minutos. A integridade celular foi determinada pelo método de Cristal Violeta. Cada valor representa a média \pm SEM de três experiências independentes, ANOVA de Tukey; * $p < 0.05$ vs Controle, @ $p < 0,05$ vs VBj.

5.2 Efeito do LED na integridade de células musculares submetidas à lesão por veneno *B. moojeni*.

A capacidade do veneno em afetar a integridade das monocamadas das células musculares C2C12 em cultura foi avaliada pelo descolamento das monocamadas, após sua incubação por 30, 60 e 120 minutos, em diferentes concentrações (5, 10, 12,5, 25, 50 e 75 µg/mL) em comparação às monocamadas contendo apenas meio de cultura (controle). Para a avaliação do efeito de LED na integridade das monocamadas de células, o mesmo foi aplicado diretamente nas células C2C12, imediatamente após a adição do veneno. Nossos resultados demonstram que houve diminuição na integridade celular em todas as concentrações e tempos analisados. Em 60 minutos o LED foi capaz de proteger as células contra ação do veneno em 16% na concentração de 12,5 µg, 35% em 25 µg, 40% em 50 µg e 44% em 75 µg. Em 120 minutos houve diminuição na integridade celular em todas as concentrações quando comparados com o grupo controle, o LED não foi capaz de proteger as células contra a ação do veneno.

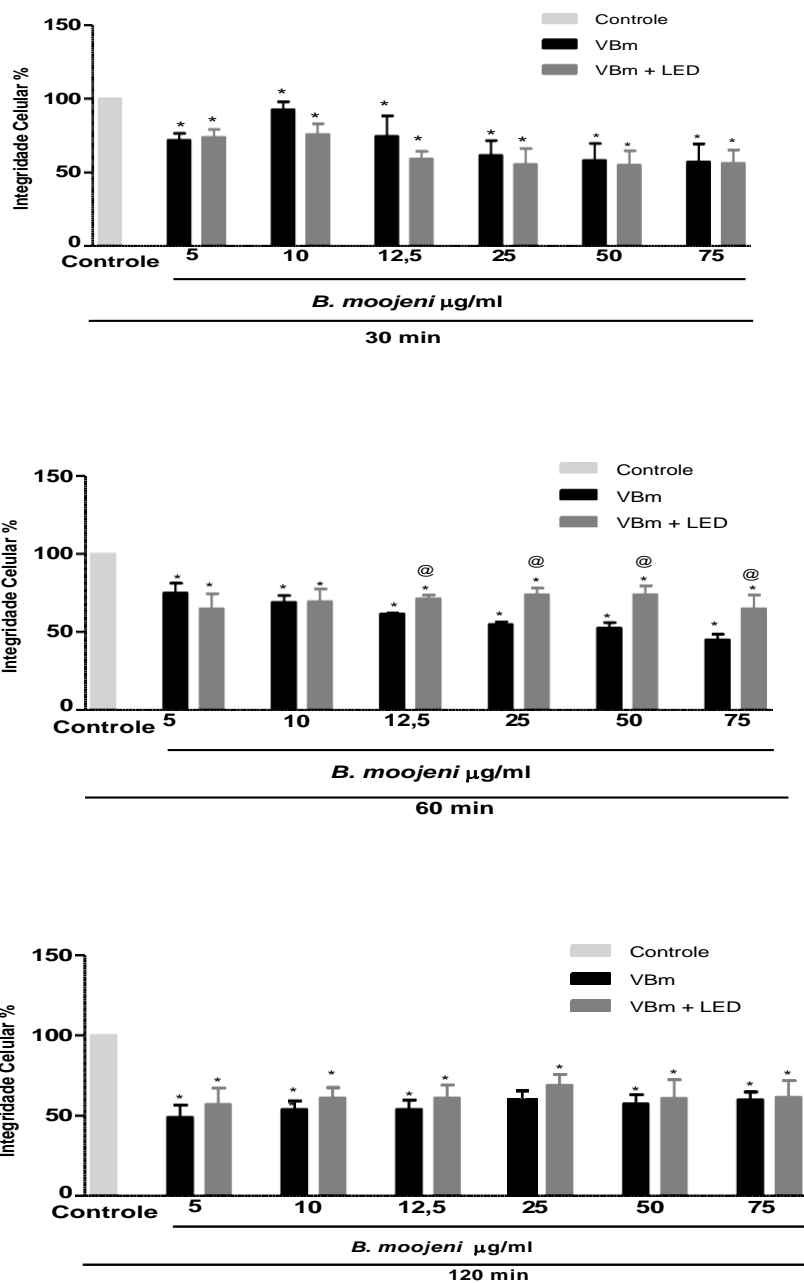


Figura 5 - Efeito LED na integridade de células musculares C2C12 após incubação com veneno de *B. moojeni*. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços 1×10^4 e incubadas durante 24 horas para a adesão celular. Após este período o veneno foi adicionado em diferentes concentrações e as células foram imediatamente irradiados com LED logo após foram incubadas durante 30, 60 e 120 minutos. A integridade celular foi determinada pelo método de Cristal Violeta. Cada valor representa a média \pm EPM de três experiências independentes, ANOVA de Tukey; * $p < 0,05$ vs Controle, @ $p < 0,05$ vs VBm.

5.3 Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno *B. jararacussu*.

O efeito do LED sobre a viabilidade de células C2C12 foi analisado nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após a adição do veneno nas concentrações de 5, 10, 12.5, 25, 50 e 75 µg/mL. Os resultados demonstraram que no tempo de 30, 60 e 120 min o veneno causou uma diminuição da viabilidade celular. O LED não foi capaz de reverter esse efeito do veneno aos 30 e 120 min em nenhuma das concentrações utilizadas. No entanto, aos 60 min o LED apresentou um aumento significativo da viabilidade celular nas concentrações de 50 e 75 µg/mL (fig. 6)

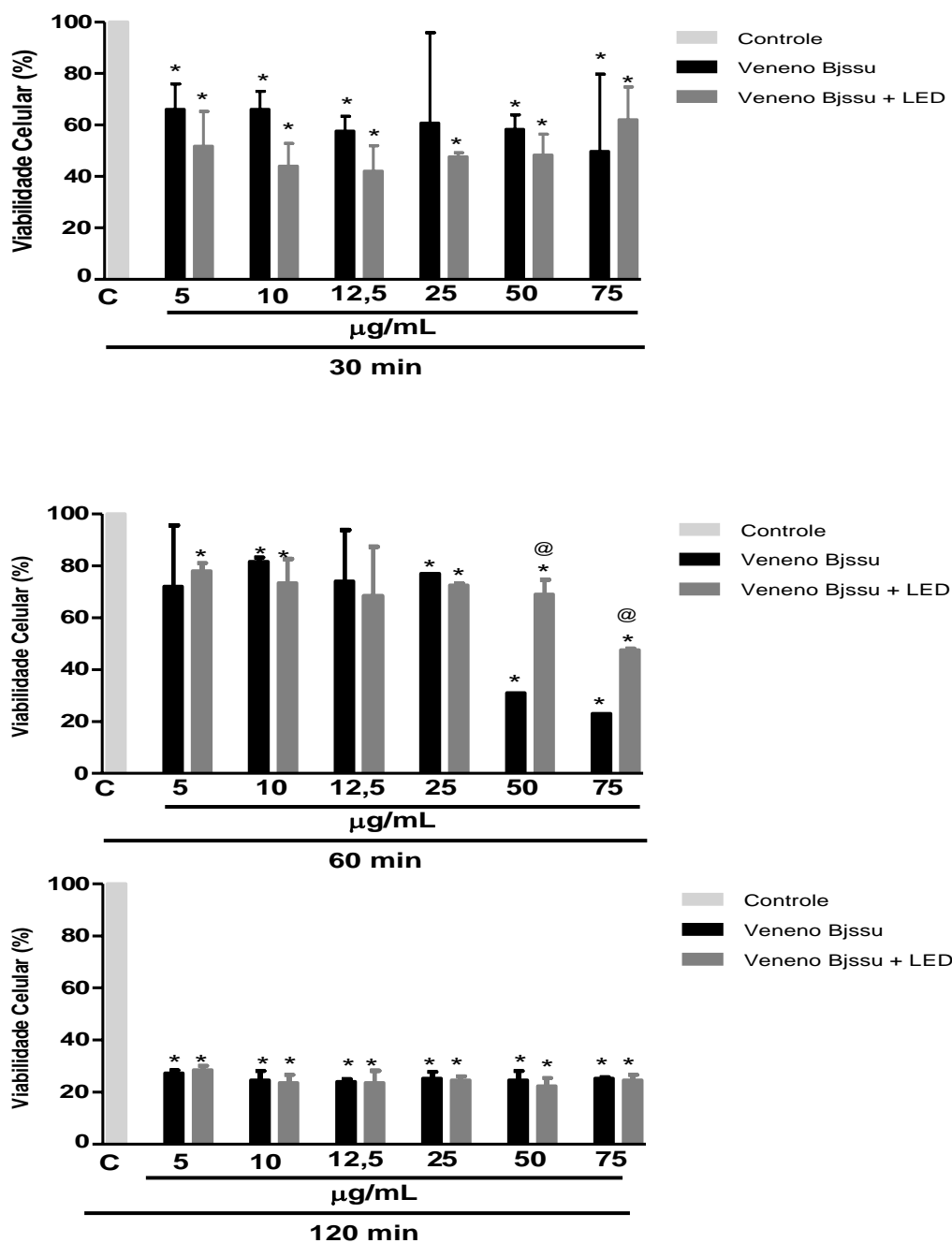


Figura 6: Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno *Bothrops moojeni*. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços 1×10^4 e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno, as células foram imediatamente irradiadas com LED e foram incubadas por 30, 60 e 120 minutos. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Cada valor representa a média \pm EPM de três experimentos independentes, Anova Tukey; * $p \leq 0,05$ comparado ao controle e @ $p \leq 0,05$ e comparado ao grupo veneno.

5.4 Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno *B. moojeni*.

O efeito do LED sobre a viabilidade de células C2C12 foi analisado nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após a adição do veneno nas concentrações de 5, 10, 12.5, 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram que no tempo de 30, 60 e 120 min o veneno causou uma diminuição da viabilidade celular. O LED não foi capaz de reverter esse efeito do veneno aos 30 e 60 min em nenhuma das concentrações utilizadas. Aos 120 min o LED apresentou uma diferença estatisticamente significativa com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Fig.7)

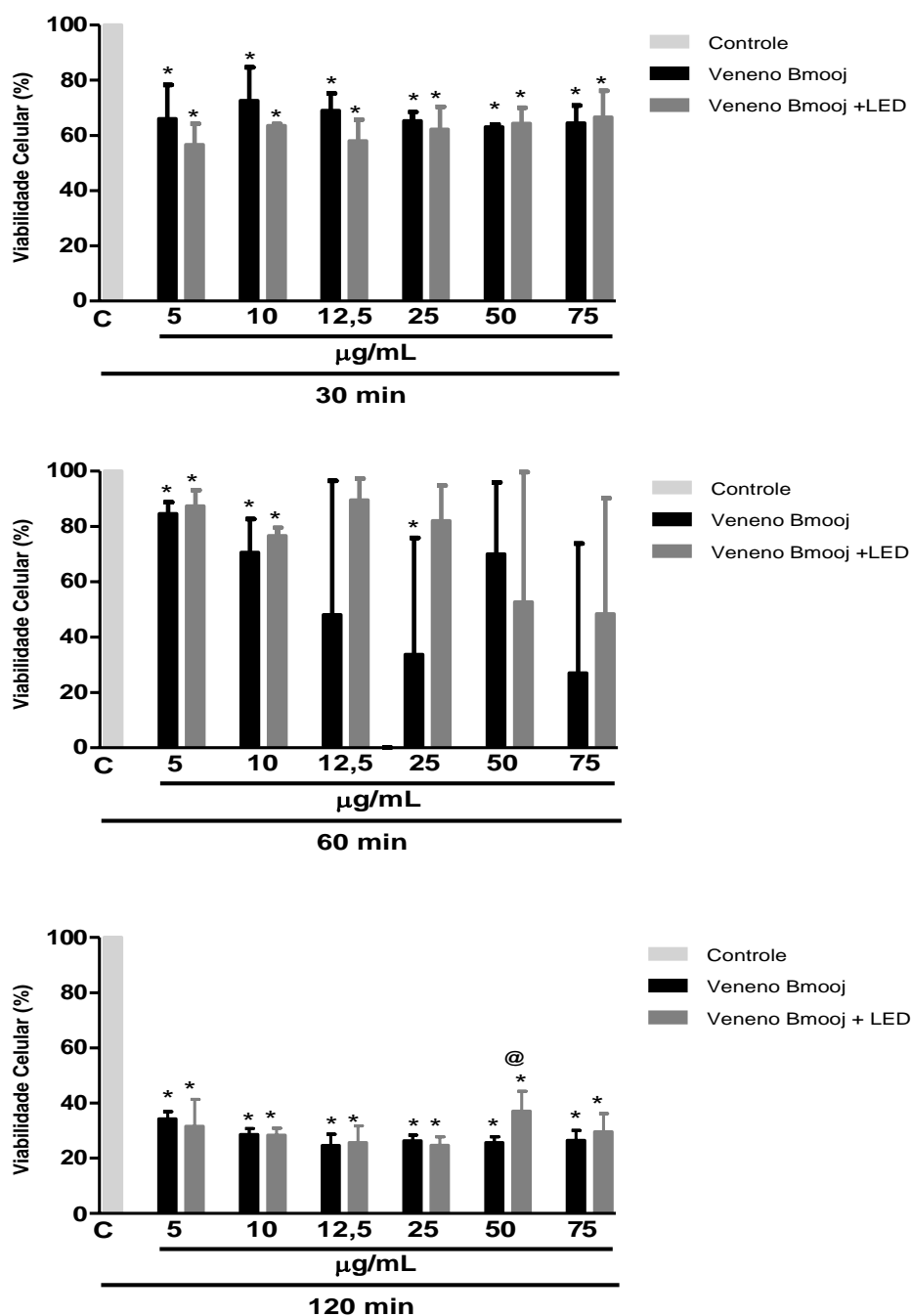


Figura 7: Efeito do LED na viabilidade de células musculares submetidas à lesão por veneno *Bothrops moojeni*. Células musculares C2C12 foram plaqueadas em placas de 96 poços 1×10^4 e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno, as células foram imediatamente irradiadas com LED e foram incubadas por 30, 60 e 120 minutos. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Cada valor representa a média \pm EPM de três experimentos independentes, Anova Tukey; * $p \leq 0,05$ comparado ao controle e @ $p \leq 0,05$ e comparado ao grupo veneno.

6. Discussão

A mionecrose local é uma ocorrência comum em quadros de envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops*. De acordo com achados na literatura, a mionecrose local é causada por miotóxicas com características de fosfolipase A2 (FLA2) ^(15,16). As fosfolipases são extensamente presentes nos venenos de serpentes. Estas enzimas apresentam habilidade de causar rápida necrose das fibras do músculo esquelético, sendo, portanto, classificadas como FLA2 miotóxica ⁽⁶⁵⁾. A soroterapia é o tratamento que apresenta melhor eficácia em neutralizar os efeitos sistêmicos causados pelo envenenamento botrópico, no entanto, essa se mostra ineficaz em reverter os danos locais ^(66,67). Dessa forma, faz-se necessário a descoberta de novas práticas terapêuticas que, possam dar suporte a soroterapia no tratamento do acidente botrópico. Terapias utilizando fonte de luz como a laserterapia de baixa intensidade (LBI) tem se mostrado eficaz na redução dos efeitos locais induzidos por serpentes botrópicas ^(8,64,63,68,69) Para obter os resultados demonstrados nesse estudo, foram utilizados mioblastos de linhagem C2C12, para avaliar os efeitos dos venenos em célula muscular. O uso de músculos esqueléticos mioblastos/miotubos como alvos para o veneno de serpente, bem como suas substâncias isoladas como metaloproteinase e miotoxinas tem sido proposta como uma alternativa viável no modelo *in vitro* para estudar mecanismos miotóxicos, visto que se correlaciona com miotoxicidade *in vivo* ⁽²⁸⁾.

Atualmente o LED (Light Emitting Diodes) está sendo investigado na área biológica como alternativa para terapias que utilizam LBI, visando o seu baixo custo, praticidade e reduzido consumo de energia ^(70,71)

Assim, este trabalho visou o melhor entendimento da aplicação do LED, em células musculares, após lesão pelo veneno das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. Para tanto, o presente trabalho investiga a capacidade desses venenos em alterar a integridade celular. Nossos resultados demonstram que ambos os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* foram capazes de alterar a integridade celular. Os resultados apresentados demonstram que o

veneno de *B. jararacussu* e *B. moojeni* afetaram a integridade das monocamadas de células musculares em todas as concentrações e tempos analisados. Os resultados obtidos são similares aos encontrados na literatura que demonstra que os principais componentes do veneno responsáveis por afetar a integridade das monocamadas celular são as metaloproteinases um dos componentes do veneno (BRENES et al., 2010).

A literatura tem sugerido que a terapia utilizando fontes de luz como LBI se apresenta como competente alternativa para o tratamento de acidentes ocasionados por serpentes devido a sua eficácia em diminuir a inflamação, hemorragia e mionecrose após envenenamento botrópico experimental ^(61,62,63) Porém, os mecanismos biológicos envolvidos na proteção local pela irradiação laser contra a ação local do veneno botrópico ainda não são compreendidos.

Quando utilizado a aparelho laser, deve-se escolher o comprimento de onda, bem como, ajustar alguns parâmetros para obter os efeitos fisiológicos desejados. Dos parâmetros que descrevem o laser, o comprimento de onda é extremamente importante, pois é ele quem define a profundidade de penetração no tecido alvo ⁽⁷²⁾. De acordo com Basford (1989) ⁽⁷³⁾; Yen; Ling; Chan (1982) ⁽⁷⁴⁾, a densidade de energia é o parâmetro mais relevante, pois esta determina a energia entregue ao tecido biológico, uma vez que a resposta fisiológica é dose - dependente. Neste estudo, foi utilizado o LED no comprimento de onda vermelho (636 nm) com uma densidade de energia de 4 J/cm². A escolha deste parâmetro foi feita com base na literatura que demonstra que a irradiação mais efetiva está na escala do vermelho e infravermelho (670 a 950 nm) ⁽⁵⁹⁾.

Para verificar a capacidade do o LED em proteger a integridade da monocama de células muscular após a administração dos venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, as células foram irradiadas e encubadas em três diferentes tempos 30, 60 e 120 minutos logo após a administração do veneno. Nossos resultados demonstram que aos 120 minutos a radiação LED nos parâmetros utilizados foi capaz de proteger a monocamada das células musculas contra a ação do veneno de *B. jararacussu* em 43% na dose de 5 µg, 38% em 10 µg, 25% em 12,5 µg, 15% em 25 µg e 13% em 50µg/mL. Esse efeito protetor

também pode ser observado em células submetidas a lesão por veneno de *B. moojeni* em 16% na concentração de 12,5 µg, 35% em 25 µg, 40% em 50 µg e 44% em 75 µg. Esses resultados estão de acordo com trabalhos já realizados por nosso grupo, que mostra que a terapia com laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 660 nm foi capaz de proteger a integridade de células epiteliais tEND contra os danos causados por veneno de *B. jararaca*.⁽⁷⁵⁾.

Adicionalmente, esse trabalho investigou a capacidade do veneno em afetar a viabilidade celular. Inicialmente, a viabilidade celular, na presença do veneno, essa foi avaliada pela atividade metabólica mitocondrial, que consiste na capacidade das células C2C12 em reduzir o composto formazan, produto cromogênico. Essa característica é evidenciada apenas em células vivas, viáveis, que são capazes de reduzir o MTT em formazan por desidrogenases mitocondriais, sendo a produção de formazan diretamente proporcional a viabilidade celular. Os resultados obtidos mostraram que os venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram capazes de diminuir a viabilidade celular em todas as concentrações e períodos analisados. Estes resultados estão de acordo com literatura que mostra a capacidade citotóxica do veneno bruto e de miotoxinas isoladas de venenos botrópicos sobre cultura de mioblastos de linhagem C2C12 ^(28,76,77,78). Terapias utilizando fontes de luz com o LBI é vista eficaz alternativa para o tratamento dos efeitos locais causados por serpentes botrópicas devido a sua eficácia em reduzir processo inflamatório, bem como, hemorragia e mionecrose após envenenamento botrópico experimental, *in vivo*, tanto com veneno bruto quanto com miotoxinas isoladas ^(61,63,69). Porém, os mecanismos envolvidos na proteção local pela irradiação laser contra a ação local do veneno botrópico ainda não são compreendidos.

Neste estudo, investigamos a capacidade do LED em proteger as células musculares contra ação do veneno de serpentes do gênero bothrops. Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que o LED nos parâmetros já estabelecidos nesse trabalho apresentou aumento significativo na viabilidade de células musculares após exposição ao veneno *B. jararacussu* apenas aos 60 min nas concentrações de 50 e 75 µg/mL. Da mesma forma, foi investigado nesse

estudo se o LED seria capaz de aumentar a viabilidade das células musculares após exposição ao veneno de *B. moojeni*. Os resultados demonstram que houve um aumento da viabilidade celular decorrente do efeito do LED apenas aos 120 min na concentração de 50 µg/mL. No entanto, não está claro o mecanismo pelo qual o LED protege a célula muscular da ação dos venenos, esse efeito pode ser resultante tanto de uma parcial ou mesmo total proteção da célula, ou por estimulação da proliferação de células sobreviventes. Os resultados obtidos são parcialmente semelhantes aos já publicados por nosso grupo, onde o uso da LBI na viabilidade celular se mostrou mais eficaz⁽⁷⁹⁾.

É possível considerar que o uso do LED como terapia utilizando luz em parâmetros específicos descritos neste estudo foi capaz de compensar os efeitos citotóxicos causados por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. É bastante provável que dois ou mais mecanismos de ação da fototerapia tenha ocorrido simultaneamente nas culturas irradiadas e foram responsáveis pela resposta biológica observada. O aumento da atividade celular por aumento do metabolismo (atividade mitocondrial) decorrente da irradiação LED, com os venenos alvo desse estudo, pode ser considerado como um efeito benéfico da terapia. A partir dos parâmetros utilizados neste trabalho, que demonstraram eficácia na compensação da citotoxicidade dos venenos, podemos sugerir que o LED seja uma ferramenta eficaz com efeitos importantes na diminuição dos efeitos locais causados por envenenamento botrópico.

7. Conclusão

- ❖ O veneno bruto de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, nas concentrações utilizadas, foram capazes de diminuir a integridade e viabilidade celular nos tempos analisados.
- ❖ A radiação LED, nos parâmetros utilizados, promoveram redução no descolamento das células C2C12 frente ao veneno de *B. jararacussu* e *B. moojeni* dose tempo dependente.
- ❖ A radiação LED, nos parâmetros utilizados, foi parcialmente capaz de proteger as células musculares da ação dos venenos em diminuir a viabilidade celular.

8. Referências

1. MOURA-DA-SILVA, A.M.; C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 60, 2012. 280-289.
2. CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ.* 1998; 76:515-524.
3. BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. *Jornal Brasileiro de Medicina*, 1993; 65:209-250.
4. Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes por Animais Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.
5. TAKEYA, H.; ODA, K.; ONIKURA, A.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; OMORI-SATOH T. The structure and function relationships of hemorrhagic factors isolated from the venoms of *Trimeresurus flavoviridis* and *Crotalus ruber*. *Jpn L Med Sci Biol.* 1990. Dec;43(6):252-3.
6. ZYCHAR, B.C.;N DALE, C.S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Tpxicon* 55; 2010. 227-234.

7. BRUSERUND, O. The Snake Venom Rhodocytin from *Calloselasma rhodostoma*- A clinically important toxin and a useful experimental tool for studies of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2). *Toxins*. 2013, 5, 665-674.
8. DOIN-SILVA, R.; BARANAUSKAS, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. *Photochem Photobiol*. 2009 Jan-Feb;85(1):63-9.
9. MILANI JUNIOR, R. *ET AL.*, SNAKE BITES BY THE JARARACUSSU (*BOTHRUPS JARARACUSSU*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State. Brazil. *QJM*; 1997; 90(5): 323-334.
10. CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 2002 Nov;40 (11):1571-9.
11. JORGE, M.T.; MENDONÇA, J.S.DE; RIBEIRO, L.A.; SILVA, M. L.R. DA; KUSANO, E.J.U.; & CORDEIRO, C.L. DOS S. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops Jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 32 (1): 6 – 10, 1990.

12. GUTIÉRREZ JM, THEAKSTON RD, WARRELL DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 2006;3:e150.
13. WHO. Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Geneva: World Health Organization; 2007.
14. GUTIÉRREZ JM, LEÓN G, BURNOUF T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals*. 2011 May;39(3):129-42. doi:10.1016/j.biologicals.2011.02.005. Epub 2011 Mar 23. PubMed PMID: 21429763.
15. GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L., ODELL, G.V., 1984. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.* 40, 367-379.
16. BRENES, F., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., 1987. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. *Toxicon* 25(5):574-577.
17. 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. 26: 247-253, 1984.

18. BISCHOFF; HEINTZ, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. **Dev. Dyn.** 201(1): 41-54, 1994.
19. 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.** 142: 537-544, 1998.
20. 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.** 50:589-610, 2002
21. KUMAR, A.; MOHAN, S.; NEWTON, J.; REHAGE, M.; TRAN, K.; BAYLINK, D.J. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. **J Biol Chem.** 280 (45):37782–37789, 2005.
22. YEN, Y.P.; TSAI, K.S.; CHEN, Y.W.; HUANG, C.F.; YANG, R.S.; LIU, S.H. Arsenic inhibits myogenic differentiation and muscle regeneration. **Environ Health Perspect.** Jul;118(7):949-56, 2010.
23. OLSON, E.N.; PERRY, M.; SCHULZ, R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. **Dev Biol.** 172:2–14, 1995.

24. LASSAR, A.B.; SKAPEK, S.X.; NOVITCH, B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. **Curr Opin Cell Biol.** 6:788–794, 1994.
25. YAFFE, D; SAXEL, D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. **Nature.** 270:725-7, 1977.
26. GEORGES, B.; GALLAND, S.; RIGAUULT, C.; LE BORGNE, F.; DEMARQUOY, J. Beneficial effects of L-carnitine in myoblastic C2C12 cells. Interaction with zidovudine. **Biochem Pharmacol.** 65: 1483-1488, 2003.
27. 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.** Mar;97(3):369-76, 2005.
28. LOMONTE, B., ÂNGULO, Y., RUFINI, S., CHO, W., GIGLIO, J.R., OHNO, M., DANIELE, J.J., GEOGHEGAN, P., GUTIÉRREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of mitotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon** 37, 145-158, 1999.
29. Milani Junior, R., Jorge, M.T., de Campos, F.P., Bussou, A., Cardoso, J.L., Ribeiro, L.A., et al., Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinico

pathological studies of 29 cases in São Paulo State. Brazil. QJM; 1997; 90(5): 323-334.

30. Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves D L, Velarde DT, Diniz M R, Cordeiro MN.et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992; (30): 95-103.

31. HOMSI-BRANDENBURGO, M.L., QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., RODRIGUESSIMIONI, L., AND GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothrotoxin. *Toxicon*. 1988; 26:615–27.

32. GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 1995; 33 (11): 1405–1424.G

33. KOUYOUMDJIAN JÁ, POLIZELLI C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente: **Revista do instituto de Medicina Tropical**, 1989; v. 31: 84-90.

34. CARDOSO JLC, DE S FRANÇA FO, WEN FH, MALAQUE CHS, HADAD JRV. *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Ed. Sarvier, São Paulo, SP 2003; 468

35. NOGUEIRA C, SAWAYA RJ, MARTINS M. ECOLOGY OF THE PITVIPER, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **J. Herp.** 2003; v.37: 653-659.
36. BARRAVIERA B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. *Jornal Brasileiro de Medicina* 1993; 65: 209-250.
37. CHAVES, F., et al. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*. comparison between Fab and IgG. **Toxicon**, v. 41, p. 237-244, 2003.
38. GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**. 26 (4):411–413, 1988.
39. CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.
40. KOUYOUMDJIAN, J.A., POLIZELLI, C. Snake bites caused by *Bothrops moojeni*: report of 37 cases. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 30, 624–632, 1988.
41. PEREIRA, I. C.; BARBOSA, A M.; SALVADOR, M. J.; SOARES, A. M.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction

induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BTHTX-I and II. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**. V.15, n.3, p.527-545, 2009.

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

43. ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v. 12, p. 570-576, 2005.

44. OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C., PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **J. Ethnopharmacol**, v. 98, p. 213-216, 2005.

45. ROSTELATO-FERREIRA, S. L. G. B.; CINTRA, A. C. O.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Heparin at low

concentration acts as antivenom against Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. **J Venom Res.** v.15;1, p.54-60, 2010.

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

47. BAXTER, G. D. **Therapeutic laser:** Theory and practice. [s.l.]: Churchill Livingstone,. p. 1-19, 1997.

48. KITCHEN, S. S., PARTRIDGE, C. H. A review of low level laser therapy parts I: Background, Physiological effects and hazards. **Physiotherapy,** v. 77, n.3, p.161 – 163, 1991.

49. MELLO, J. B., MELLO, G. P. S. **Laser em Odontologia.** 1ª ed. São Paulo: Ed. Santo, p. 174, 2001.

50. GENOVESE, W. J. Laser de Baixa Intensidade. Aplicações Terapêuticas em Odontologia. São Paulo: Lovise, 2000.

51. BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast, p. 356, 1998.

52. BELKIN, M.; ZATURUNSKY B.; SCHWARTZ, M. A critical review of low energy laser bioeffects. **Lasers Light Ophthalmol.** v. 2, p. 63-71, 1988.

53. KARU, T.I. Photobiology of low laser effect. **Healt Physiol.** v. 56, p. 691-704, 1989.
54. MESTER, E., MESTER, A. F., MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.** v. 5, p. 31-39, 1985.
55. CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J.A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J Clin Laser Med Surg.** v. 16, p. 317-320, 1998.
56. MEDEIROS, I. S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz.** 2001. Dissertação (mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Interunidas em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
57. ZANIN, I.C.J.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA, A.JR.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: in vitro study. **J. antimicrob. chemother.**, v.56, n.2; p.324-330, 2005.

58. REBELLO, M. L. **Estudo comparativo de três sistemas de cura da resina composta para colagem de bráquete: resina ativada quimicamente, luz alógena e luz emitida por diodo (LEDs), quando submetidas ao teste de resina a tração**, 2005. 59f. Dissertação (mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba 2005.
59. KARU, T. **Low-Power Laser Therapy**. New York: CRC Press, 2003. p. 4825-4841.
60. EL SAYED, S.A.; DYSON, M. Comparisson of the effect of multiwavelength lightproduced by a clister of semiconductor diodes each individual diode on master cell numberand phosphorus metabolism. **Laser Surg Méd.**, v.10, p. 559-568, 1990.
61. DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers surg Med.** 33:352-357, 2003.
62. NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A. B.; 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.** DOI 10.1007/s10103-011-0914-1. 2012.

63. 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**, 51, p.1236-1244, 2009.
64. GUIMARAES-SOUZA, DALE C.S., NADUR-ANDRADE N., BARBOSA A M, COGO J.C., ZAMUNER S.R. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Clin Exp Med Lett**; 52(3-4): 97-102, 2011
65. HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron. microsci. rev.**, v. 3, p. 183-211, 1990.
66. ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (eds). **Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates**. New York: Academic Press, 1971. v.2, p. 346-381.
67. ZAMUNER, S.R.; DA CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, 1;44(3): 259-71, 2004.

68. BARBOSA, A.M., VILLAVERDE, A.B., GUIMARÃES-SOUZA, L., RIBEIRO, W., COGO, J.C., ZAMUNER, S.R. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyteinflux and hyperalgesia induced by Bothrops jararacussu snake venom. Clin Exp Med Lett. 2011 Dez; 52(3-4): 97-102.
69. NADUR-ANDRADE, N.; DALE, CS.; SANTOS. A.S.; SOARES, A.M.; DE LIMA, C.J.; ZAMUNER, S.R. Photobiostimulation reduces edema formation induced in mice by Lys-49 phospholipases A2 isolated from Bothrops moojeni venom. Photochem Photobiol Sci. 13(11):1561-1567, 2014.
70. KARU, T. **Cellular mechanisms of low-power laser therapy**. Advanced Energy Medicine. 2006. Disponível em:
http://www.tinnitus.us/ti_nakarupresentation.html
71. ANDRADE, M. F. et al. Avaliação da capacidade de polimerização de um novo dispositivo a base de LED à bateria. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.4, p.372-376, 2001.
72. FULLER, A.T. Fundamental of lasers in sugery and medicine. In: DIXON, J.A. (ED) **Surgical applications of lasers**. Chicago: Year Book medical Publishers, p.11, 1983.

73. BASFORD, J. R. Low-intensity laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers surg. med.**, v.9, p 1-5, 1989
74. YEW, D.; LING, W. S. L.; CHAN, Y. Stimulating effect of the low dose laser: a new hypothesis. **Acta Anatomica**, v.112, p.131-136, 1982.
75. FRANCO, ANA TEREZA BARUFI ; SILVA, LUCIANA MIATO GONÇALVES ; COSTA, MARCÍLIA SILVA ; ZAMUNER, SILVIA FERNANDA ; VIEIRA, RODOLFO PAULA ; DE FATIMA PEREIRA TEIXEIRA, CATARINA ; **Zamuner, Stella Regina** . Effect of photobiomodulation on endothelial cell exposed to Bothrops jararaca venom. *Lasers in Medical Science* **JCR** , v. 31, p. 1017-1025, 2016.
76. ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacologic properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. **Biochemie**, v. 82, p. 755-763, 2000.
77. SILVA, C.A.A., SILVA, L.M.G., ROCHA, C.R OLIVEIRA, L.V.F., MESQUITA-FERRARI, R.A, COGO J.C., ZAMUNER, S.R.,. Myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* snake venom on C2C12 muscle cells. *ClinExpMedLett*. 53(1-2): 7-10, 2012.

78. HAMZA, L.; GARGIOLI, C.; CASTELLI, S.; RUFINI, S.; LARABA-DJEBARI, F. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. *Biochimie*, 292(7):797-805, 2010.
79. SILVA, C. A. A. ; SILVA, L. M. G. ; ROCHA, C. R. ; OLIVEIRA, L.V. F. MESQUITA-FERRARI, R. A. ; COGO, J. C. ; **ZAMUNER, S. R.** . Myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* snake venom on C2C12 muscle cells. *Clinical and Experimental Medical Letters*, v. 53, p. 7-10, 2012.

9. Apêndice

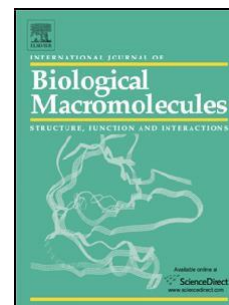
Accepted Manuscript

Title: Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A₂ myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom: *in vivo* and *in vitro* evaluation

Authors: Adriano Silvio dos Santos, Ludmila

Guimarães-Sousa, Maricilia Silva Costa, Luis Fernando Zamuner, Norma Cristina Sousa, Stephen Hyslop, Andreimar

M. Soares, Maria Cristina Chavantes, José Carlos Cogo, Stella Regina Zamuner



PII: S0141-8130(17)32332-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.076>

Reference: BIOMAC 8371

To appear in: *International Journal of Biological Macromolecules*

Received date: 28-6-2017

Revised date: 11-10-2017

Accepted date: 12-10-2017

Please cite this article as: Adriano Silvio dos Santos, Ludmila Guimarães-Sousa, Maricilia Silva Costa, Luis Fernando Zamuner, Norma Cristina Sousa, Stephen Hyslop, Andreimar M. Soares, Maria Cristina Chavantes, José Carlos Cogo, Stella Regina Zamuner, Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A₂ myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom: *in vivo* and *in vitro* evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.076>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof

before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A₂ myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom: *in vivo* and *in vitro* evaluation

Adriano Silvio dos Santos^{1*}, Ludmila Guimarães-Sousa^{2*}, Maricilia Silva Costa², Luis Fernando Zamuner¹, Norma Cristina Sousa³, Stephen Hyslop³, Andreimar M. Soares⁴, Maria Cristina Chavantes¹, José Carlos Cogo⁵, Stella Regina Zamuner¹

¹Department of Medicine, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro, 235, 01504-000, São Paulo, SP, Brazil

²Institute of Research and Development, University of Vale do Paraíba (UNIVAP), Avenida Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, Urbanova, São José dos Campos, SP, Brazil

³Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas, SP, Brazil

⁴Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rua da Beira, 7671, 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia e Engenharia Biomédica, Universidade Brasil, Rua Carolina Fonseca 235/584, 08230-030, São Paulo, SP, Brazil

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Stella Regina Zamuner, PhD. Rua Vergueiro, 235, Bairro Liberdade, 01504-000, São Paulo, SP, Brazil. Tel. +55-11-3385-9222.

E-mail: stella.rz@uni9.pro.br

5.1 Abstract

This report describes the effect of photobiomodulation (PBM) on edema formation, leukocyte influx, prostaglandin E₂ (PGE₂) biosynthesis and cytotoxicity caused by bothropstoxin-I (BthTX-I), a phospholipase A₂ (PLA₂) homologue isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Swiss mice or C2C12 cells were irradiated with low-level laser (LLL) at 685 nm wavelength, an energy density of 4.6 J/cm² and an irradiation time of 13 s. To evaluate the effect on edema formation and leukocyte influx, LLL was applied to the site of inoculation 30 min and 3 h post-injection. C2C12 cells were exposed to BthTX-I and immediately irradiated. PBM significantly reduced paw edema formation, peritoneal leukocyte influx and PGE₂ synthesis, but increased the viability of C2C12 muscle cells after BthTX-I incubation. These findings demonstrate that PBM attenuated the inflammatory events induced by BthTX-I. The attenuation of PGE₂ synthesis could be an important factor in the reduced inflammatory response caused by laser irradiation. The ability of LLL irradiation to protect muscle cells against the deleterious effects of BthTX-I may indicate preservation of the plasma membrane.

Keywords: BthTX-I; cytotoxicity; inflammation; photobiomodulation

1. Introduction

Snakebite is a neglected disease worldwide and a serious health problem in Brazil, with the majority (90%) of venomous snakebites in this country being caused by the genus *Bothrops* [1]. *Bothrops* venoms cause important local tissue damage characterized by intense pain, swelling, leukocyte influx, bleeding and myonecrosis that may lead to permanent tissue loss and functional disability [1,2]. *Bothrops jararacussu* is a large pitviper found in southeastern Brazil and its venom is one of the most myotoxic of these genera [3]. Bothropstoxin-I (BthTX-I), the major phospholipase A₂ (PLA₂) myotoxin present in *B. jararacussu* snake venom [4], has an important role in the pathogenesis of the myonecrosis and inflammatory response caused by this venom [4-6].

The most effective treatment for envenomation by *Bothrops* sp. is antivenom (AV) therapy that neutralizes circulating venom and reverses venom-induced systemic effects such as coagulopathy [1,2,7]. However, AV therapy does not reverse the intense local effect of these venoms [8] because of the rapid development of tissue damage after envenomation. Consequently, local tissue damage leading to necrosis may occur and is frequently followed by poor tissue regeneration, with permanent sequelae involving tissue loss and dysfunction [9,10].

Photobiomodulation (PBM) with low-level laser (LLL) or light-emitting diode (LED) has been widely used in recent years as a therapeutic measure in medical and paramedical professions [11]. PBM acts mainly on cellular organelles (mitochondria and membranes) that absorb photons and trigger chemical reactions [12]. In the short-term, PBM accelerates ATP synthesis (glucose and oxidative phosphorylation) while the long-term effect involves the modulation of DNA transcription [12,13]. We and others have demonstrated the effectiveness of PBM in attenuating the local effects of several crude *Bothrops* venoms, including edema formation [5,14], leukocyte influx [14], hemorrhage

[15] and pain [5,16]. Furthermore, Barbosa et al. [17] demonstrated that LLL therapy significantly reduced edema formation, neutrophil accumulation and myonecrosis, induced by BthTX-I and II myotoxins (both from *B. jararacussu* snake venom) in mice gastrocnemius muscle. In addition, LLL and LED treatment reduced paw edema formation induced by MjTX-I and MjTX-II, two myotoxic PLA₂ isolated from *B. moojeni* venom [18]. Although several authors have demonstrated the effect of PBM in diminishing the local effects of *Bothrops* venom, the mechanism underlying this beneficial action is unknown.

To increase our understanding of the protective action of PBM therapy against the local tissue damage caused by *Bothrops* venoms, in this study we investigated the effect of LLL therapy on paw edema formation, peritoneal leukocyte influx and PGE₂ biosynthesis induced by BthTX-I. The effect of PBM on the cytotoxicity of BthTX-I in cultured muscle cells was also evaluated.

2. Material and methods

MTT was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PGE₂ specific enzymatic immunoassay (EIA) was purchased from Cayman Chemicals (Michigan, USA). Fetal bovine serum (FBS), gentamicin and DMEM were obtained from Cultilab (São Paulo, Brazil). All salts and reagents used obtained from Merck (Darmstadt, 89 Germany) with low endotoxin or endotoxin-free grades.

2.1 Venom and purification of bothropstoxin-I

Bothrops jararacussu snake venom obtained from adult snakes of both sexes was purchased from the Centro de Extração de Toxinas Animas (CETA, Morungaba, SP, Brazil). Bothropstoxin-I (BthTX-I) was purified essentially as previously described [4], lyophilized and stored at 4 °C. A stock solution of the toxin was prepared immediately before use.

2.2 *Animals*

The animal experiments were done using 45-day-old male Swiss mice (22-25 g) that were housed in plastic cages with water and food ad libitum and maintained in temperature-controlled rooms (22°C) on a 12-h light/dark cycle. The mice were randomly allocated to experimental groups of five animals each. The general ethical guidelines of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) were followed and the experiments were approved by the Committee for Ethics in Animal Use of the University of Vale do Paraíba (UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil; license no. A28/2007/CEP).

2.3 *Hind paw edema*

A solution of BthTX-I was prepared by diluting myotoxin in 50 µL of sterile saline solution that was then administered intraplantarly (i.pl.) in the subplantar region of the right hind paw at a dose of 0.4 mg/kg. This dose was previously shown to cause marked edema [19]. The left hind paw received an equal volume of sterile saline solution and served as the control. Changes in hind paw volume were measured by plethysmometry (model 7140 plethysmometer; Ugo Basile, Comerio, Italy) before and 15 and 30 min, and 1, 2, 3 and 6 h after myotoxin administration [20]. The edema was expressed as the percentage increase in the volume of the treated (right) paw relative to that of the control (left) paw at each time point. At the end of the experiment (6 h post -injection), the mice were killed with an overdose of a mixture of xylazine hydrochloride (Xilazin™, i.p.) plus ketamine hydrochloride (Cetamin™, i.p.).

2.4 *Leukocyte influx into the peritoneal cavity*

BthTX-I (1.6 mg/kg) diluted in 1 mL of sterile saline was injected intraperitoneally (i.p.), control animals received an equal volume of sterile saline solution and 6 h later the mice were killed as described previously in item 2.3 and the leukocytes were harvested by

washing the peritoneal cavity with 2 mL of saline containing heparin (5 U/mL). Aliquots of the washes were then used to determine total cell counts in a Neubauer chamber after dilution in Turk solution (0.2% crystal violet dye in 3% acetic acid). Differential leukocyte counts were done on stained Instant Prov.

2.5 *PGE₂ quantification*

PGE₂ was quantified with a specific, commercial enzyme immunoassay [21] in peritoneal washes (see previous section) obtained 1, 3 and 6 h after BthTX-I (1.6 mg/kg) injection. The eicosanoids were extracted on SepPak C18 columns (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and eluted with ethanol. For quantification, 50 µL of each extracted sample was incubated with the eicosanoid conjugated with acetylcholinesterase and specific rabbit antiserum in 96-well plates coated with anti-rabbit IgG mouse monoclonal antibody. After the addition of substrate, the sample absorbances were recorded at 405 nm in a microplate reader (Labsystem Multiscan[®]) and the eicosanoid concentrations were estimated from a standard curve.

2.6 *Cell culture*

Murine C2C12 muscle cells were used to assess the cytotoxicity of BthTX-I. For myoblast maintenance, the cells were cultured in growth medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic-antimycotic solution in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The culture medium was changed every two days.

2.7 *Cell viability*

C2C12 cells were seeded at 1×10^4 cells/well in 96-well plates. After 24 h incubation, the medium was replaced with the same medium containing BthTX-I (10, 25, 50 and 75 µg/mL). Control cells were incubated with the same volume of culture medium without myotoxin. After incubation for 15, 30 or 60 min, the medium was discarded and

cell viability was determined. For this, the cells were washed with 100 mL of 1× PBS followed by the addition of 50 µL of MTT (0.5 µg/mL in buffer; 3-[4,5-dimethylthiazol-2YL]-2.5 diphenyltetrazolium-bromide) and incubation for 3 h at 37 °C. After incubation, 100 µL of isopropanol was added to resuspend and solubilize the precipitate. The absorbance of the supernatant was then measured spectrophotometrically in an ELISA reader at 620 nm.

2.8 Laser irradiation

A low-level semiconductor Ga-As laser (Theralase D.M.C., São Carlos, SP, Brazil), operating at a wavelength of 685 nm (red laser), was used to irradiate mice and C2C12 cells. The laser parameters were a power of 100 mW, an irradiation time of 13 s with spacer beam and an irradiated area of 0.28 cm² that corresponded to a laser dose of 4.6 J/cm². The laser dose was low enough to avoid any thermal effect and was chosen based on previous work that showed a beneficial effect of LLL [22]. The mice were immobilized manually and LLL irradiation was applied to the area injected with BthTX-I or saline solution. The mice were irradiated 30 min and 3 h after myotoxin injection to evaluate the effect on edema formation or leukocyte influx. Control mice underwent the same experimental procedure but with the laser device turned off.

C2C12 cells were irradiated immediately upon addition of the myotoxin in culture, with the laser being applied directly to the cells through the bottom of each well. The experiments were done in a partially darkened environment to minimize interference from external light. The output power of the laser equipment was measured using a Laser Check[®] power meter (MM Optics, São Carlos, SP, Brazil).

2.9 Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm SEM and statistical comparisons were done using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ indicated significance.

3. Results

3.1 PBM attenuates BthTX-I-induced edema formation

The intraplantar injection of BthTX-I (0.4 mg/kg) caused prominent edema that was maximal 1 h after myotoxin injection and persisted for up to 3 h; a marked decrease was observed after 6 h, but the edema was still significantly greater than in saline-injected (control) mice (Fig. 1). LLL irradiation significantly attenuated edema formation by 55.6 % (n=5) and 78.2 % (n=5) at 60 and 180 min, respectively, compared to the response with BthTX-I alone. At 180 min, the extent of edema formation was not significantly different from that observed in saline-treated control mice. A further application of LLL at 180 min did not affect the resolution of edema over the ensuing 3 h (up to 360 min post-injection) when compared to the saline-injected mice (Fig. 1). These results indicate that treatment with LLL 30 min after toxin injection was sufficient to attenuate edema formation and lead to resolution by 3 h post-injection when compared to the saline-treated controls; a second application of LLL at 3 h produced no additional beneficial effect.

3.2 PBM inhibits the BthTX-I-induced influx of peritoneal leukocytes

Leukocyte migration into the peritoneal cavity was evaluated 6 h after the i.p. injection of BthTX-I (1.6 mg/kg). BthTX-I stimulated a migration of leukocytes that was significantly greater than that in saline-treated (control) mice; treatment with LLL prevented this migration, with the number of migrating cells being similar to that in control mice (BthTX-I + LLL: $3.8 \pm 0.3 \times 10^6$ cells/mL vs. Control: $3.8 \pm 0.2 \times 10^6$ cells/mL; n=5) (Fig. 2A). Differential leukocyte counts showed that although the absolute numbers of polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) cells after stimulation

with BthTX-I were similar (PMN: $4.9 \pm 0.4 \times 10^6$ cells/mL; MN: $4.0 \pm 0.5 \times 10^6$ cells/mL; n=5), most of the BthTX-I-induced increase in cell migration was attributable to an influx of PMN rather than MN cells, primarily because of a difference in the basal migration of these two cell types in saline-treated controls (Fig. 2B,C). LLL irradiation significantly attenuated the migration of both cell types when compared to treatment with BthTX-I alone. However, treatment with LLL did not completely prevent the migration of PMN cells compared to control mice (Fig. 2B), in contrast to MN cells for which the migration was less than that in control mice (Fig. 2C).

3.3 PBM prevents the BthTX-I-induced increase in PGE₂ formation

BthTX-I significantly stimulated PGE₂ formation in the mouse peritoneal cavity at 1, 3 and 6 h post-injection compared to saline-treated mice; production was similar after 1 and 3 h but there was a marked increase at 6 h compared to the first two intervals (Fig. 3). Irradiation with LLL had no effect on PGE₂ formation at 1 h post-injection but virtually abolished the increase in PGE₂ production at 3 and 6 h after BthTX-I injection; the PGE₂ concentrations at these intervals were not significantly different from those saline-treated (control) mice.

3.4 PBM attenuates the BthTX-I-induced loss of viability in C2C12 muscle cells

The incubation of C2C12 muscle cells with BthTX-I (10-75 $\mu\text{g/mL}$) for 15-60 min resulted in a progressive loss of viability that was generally significant at concentrations ≥ 25 $\mu\text{g/mL}$; the greatest decrease occurred at the highest toxin concentration (Fig. 4). LLL alone had no effect on the viability of C2C12 cells but significantly attenuated the loss of viability in cells incubated with BthTX-I (75 $\mu\text{g/mL}$) for 15-60 min (the protection against loss of viability was 24 %, 41 % and 72 % at 15, 30 and 60 min, respectively). However, the viability of these toxin-treated cells exposed to LLL was still significantly less than that of control cells (Fig. 5).

4. Discussion

Tissue damage is an important local effect of *Bothrops* venoms that is not neutralized by conventional antivenom therapy. In the case of *B. jararacussu* envenomation, the most effective treatment involves the administration of a combination of anti-bothropic and anti-crotalic antivenom in order to neutralize the myotoxic and neuromuscular activities of the venom [23-25]. However, extensive necrosis is frequently followed by poor tissue regeneration that can lead to permanent sequelae involving tissue loss and dysfunction [26]. For this reason, alternative therapeutic strategies for treating venom-induced muscle damage and enhancing tissue repair have been sought. Among the different alternatives studied with the purpose to diminish the local reaction of envenoming, phototherapy with low-level laser (LLL) or light-emitting diode (LED) has been reported to have beneficial effects in attenuating the local responses induced by *Bothrops* snake venoms [5,14-18,22].

PLA₂s from snake venom are among the major mediators of leukocyte influx [27], edema formation [28] and myonecrosis [29] after snakebite envenoming. In this study, the effect of LLL irradiation in the local inflammatory reaction, characterized by edema formation and leukocyte influx, caused by BthTX-I was investigated. As shown here, LLL was effective in reducing BthTX-I-induced paw edema formation. This finding agrees with previous observations on the ability of LLL to attenuate edema formation caused by BthTX-I and BthTX-II in mouse gastrocnemius muscle [17] and by myotoxic PLA₂s from *Bothrops moojeni* venom in mouse hind paw [18]. However, the mechanism by which PBM reduces PLA₂ myotoxin-induced edema formation is unknown.

Bothrops venom-induced paw edema depends on the release of vasoactive substances such as prostaglandins E₂ (PGE₂) [21] and the intraperitoneal injection of a PLA₂ myotoxin from *Bothrops asper* venom induced a rapid, sustained release of PGE₂

[30]. As shown here, BthTX-I also stimulated the formation of PGE₂ in the mouse peritoneal cavity and this production was attenuated by LLL therapy. A similar reduction in PGE₂ formation in the hind paw may have contributed to the attenuation of BthTX-I-induced paw edema by LLL. Our finding agrees with the ability of LLL to reduce PGE₂ formation in response to mechanical stretching in human periodontal ligament and experimental arthritis [31,32].

LLL irradiation reduced the BthTX-I-induced migration of PMN and MN leukocytes into the mouse peritoneal cavity. PBM also attenuates the migration of these cells in other inflammatory conditions [33,34]. Leukocyte migration to lesioned tissue requires adhesion molecules of the selectin, integrin and immunoglobulin families, as well as inflammatory cytokines [35]. Wang et al. [36] reported that LLL treatment inhibited intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in a rat model of lipopolysaccharide (LPS)-induced mastitis. In addition, PBM inhibits the expression and secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the initial stages of inflammation [16,33,34]. Therefore, the decrease in leukocyte migration seen here after LLL therapy may have been related to the inhibition of adhesion molecule expression and to the modulation of inflammatory cytokines. Indeed, PLA₂ myotoxins can stimulate the release of cytokines involved in leukocyte recruitment [27].

Myotoxic PLA₂s from snake venom are the principal cause of local tissue damage [29] and can induce rapid plasma membrane damage, followed by a series of cellular degenerative events such as myofilament hypercontraction, mitochondrial swelling and disruption and disorganization of the sarcoplasmic reticulum [37]. Part of the LLL-mediated protection against *Bothrops* venom-induced tissue damage may be related to the ability of LLL to protect against disruption of the plasma membrane by venom toxins [14,17,38]. Myotoxic PLA₂s can stimulate the release of large amounts of K⁺ and ATP

from skeletal muscle that can amplify the action of these myotoxins [39]. We have previously demonstrated that PBM increases the intracellular concentration of ATP while decreasing the extracellular content of this compound after exposure to *B. jararacussu* snake venom [22]. Based on these reports, we suggest that the ability of LLL to partially restore the viability of C2C12 after exposure to BthTX-I was related to an attenuation of plasma membrane damage and consequent reduced loss of intracellular ATP by the cell.

In conclusion, BthTX-I caused marked mouse paw edema and intraperitoneal leukocyte infiltration, both of which were attenuated by PBM. Part of this attenuation was probably related to the reduced release of PGE₂ after LLL irradiation. In addition, LLL irradiation was probably cytoprotective through its ability to mitigate BthTX-I-mediated plasma membrane damage. The ability of LLL irradiation to attenuate an intense local reaction such as edema suggests that PBM could be a useful ancillary measure in the clinical management of patients bitten by *Bothrops* snakes.

5.1 **Conflict of interest**

There is no conflict of interest statement.

5.1 **Acknowledgments**

The authors express their gratitude to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support. Stella Regina Zamuner is a recipient of productivity grant 310590/2014-0 from CNPq. Adriano Silvio Santos and Ludmila Guimarães Souza, are recipients of Master's fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa de São paulo (FAPESP), grants 2013/23757-0 and 2007/07137-0 respectively.

5.1 Authorship

S.R.Z. designed the study; A.S.S., L.G.S., L.F.Z. and N.C.S. performed the experiments; S.R.Z., A.S.S. and L.G.S. collected and analyzed the data; S.R.Z., S.H., J.C.C., A.M.S. and M.C.C. provided reagents; S.H. isolated and provided the BthTX-I; S.R.Z., M.C.C. and S.H. wrote the manuscript. All of the authors discussed the results and implications and commented on the manuscript at all stages.

5.1 References

1. F.O.S. França, C.M.S. Málaque, Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V (eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier/FAPESP, São Paulo, 2009, pp. 81-95.
2. D.A. Warrell, Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds.), *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*, vol. 2. Comstock Publishers/Cornell University Press, Ithaca, (2004) pp. 709-761.
3. R. Milani, M.T. Jorge, F.P. Ferraz de Campos, F.P. Martins, A. Bousso, J.L.C. Cardoso, L.A. Ribeiro, H.W. Fan, F.O.S. França, I.S. Sano-Martins, D. Cardoso, I.C.O.F. Fernandez, F.C. Fernandes, V.L. Aldred, M.P. Sandoval, G. Puerto, R.D.G. Theakston, D.A. Warrell, Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil, *Q. J. Med* 90 (1997) 323-334.
4. M.L. Homs-Brandeburgo, L.S. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, J.R. Giglio, Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin, *Toxicon* 26 (1988) 15-27.
5. L.G. Souza, C.S. Dale, N. Nadur-Andrade, A.M. Barbosa, J.C. Cogo, S.R. Zamuner, Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom, *Clin Exp Med Lett*. 52 (2011) 97-102.

6. S.H. Andrião-Escarso, A.M. Soares, V.M. Rodrigues, Y. Angulo, C. Díaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, J.R. Giglio, Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*, *Biochimie* 82 (2000) 755-763.
7. F. Bucarechi, S.R. Herrera, S. Hyslop, E.C. Baracat, R.J. Vieira, Snakebites by *Bothrops* spp. in children in Campinas, São Paulo, Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 43 (2001) 329-333.
8. K.U. Camey, D.T. Velarde, E.F. Sanchez, Characterization and neutralization of the venoms used in the production of bothropic antivenom in Brazil, *Toxicon* 40 (2002) 501-509.
9. J.M. Gutiérrez, D. Williams, H.W. Fan, D.A. Warrell, Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. *Toxicon* 56 (2010) 1223-1235.
10. D.A. Warrell Clinical features of envenoming by snake bites. In: Bon C, Goyffon M (eds.), *Envenomings and their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, (1996) pp.63-76.
11. WS, Kim, R.G. Calderhead, Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther.* 20 (2011) 205-215.
12. T. Karu, Photobiological fundamentals of low-power laser therapy, *IEEEJ. Quant. Elect.* 23 (1987) 1703-1717.
13. T. Karu, Photobiology of low laser effect. *Health Physiol* 56 (1989) 691-704.
14. A.M. Barbosa, A.B. Villaverde, L. Guimarães-Souza, W. Ribeiro, J.C. Cogo, S.R. Zamuner, Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom, *Toxicon* 51 (2008) 1236-1244.
15. N. Nadur-Andrade, A.M. Barbosa, F.P. Carlos, C.J. Lima, J.C. Cogo, S.R. Zamuner,

- Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 65-70.
16. N. Nadur-Andrade, C.S. Dale, V.R. Oliveira, E.F. Toniolo, R.D. Feliciano, J.A. da Silva Jr, S.R. Zamuner, Analgesic effect of photobiomodulation on *Bothrops moojeni* venom-induced hyperalgesia: a mechanism dependent on neuronal inhibition, cytokines and kinin receptors modulation, *PLoS Negl.Trop. Dis.* 10 (2016) e0004998.
 17. A.M. Barbosa, A.B. Villaverde, L. Guimarães-Sousa, A.M. Soares, S.F. Zamuner, J.C. Cogo, S.R. Zamuner, Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom, *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 16 (2010) 470-479.
 18. N. Nadur-Andrade, C.S. Dale, A.S. Santos, A.M. Soares, C.J. de Lima, S.R. Zamuner, Photobiostimulation reduces edema formation induced in mice by Lys-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops moojeni* venom, *Photochem. Photobiol. Sci.* 13 (2014) 1561-1567.
 19. I.C. Pereira, A.M. Barbosa, M.J. Salvador, A.M. Soares, W. Ribeiro, J.C. Cogo, S.R. Zamuner, Anti-inflammatory activity *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BthTX I and II, *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 15 (2009) 527-45.
 20. C.G. Van Arman, A.J. Begany, L.M. Miller, H.H. Pless, Some details of inflammation caused by yeast and carrageenan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150 (1965) 328-334.

21. R.A. Olivo, C.F. Teixeira, J.L. Wallace, J.M. Gutierrez, S.R. Zamuner, Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms, *Toxicon* 49 (2007) 670-677.
22. L.M. Silva, C.A.A. Silva, A. Silva, R.P. Vieira, R.A. Mesquita-Ferrari, J.C. Cogo, S.R. Zamuner, Photobiomodulation protects and promotes differentiation of C2C12 myoblast cells exposed to snake venom, *PLoS One*, 11 (2016) e0152890.
23. S.R. Zamuner, M.A. da Cruz-Höfling, A.P. Corrado, S. Hyslop, L. Rodrigues-Simioni. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* 1 (2004) 259-271.
24. D.G. Beghini, D.C. M.A. da Cruz-Höfling, P. Randazzo-Moura, L. Rodrigues-Simioni, J.C. Novello, S. Hyslop, S. Marangoni. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 46 (2005) 604-611.
25. S.G. De-Simone, P. Napoleão-Pego, L.A. Teixeira-Pinto, J.D. Santos, T.S. De-Simone, A.R. Melgarejo, A.S. Aguiar, D.P. Marchi-Salvador. Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A₂'s from *Bothrops jararacussu* snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. *Toxicon* 72 (2013) 90-101.
26. J.P. Chippaux, M. Goyffon, Venoms, antivenoms and immunotherapy, *Toxicon* 36 (1998) 823-846.
27. J.P. Zuliani, C.M. Fernandes, S.R. Zamuner, J.M. Gutiérrez, C.F. Teixeira, Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity, *Toxicon* 45 (2005) 335-346.

28. E.A. Corrêa, A.M. Kayano, R. Diniz-Sousa, S.S. Setúbal, F.B. Zanchi, J.P. Zuliani, N.B. Matos, J.R. Almeida, L.M. Resende, S. Marangoni, S.L. da Silva, A.M. Soares, L.A. Calderon, Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi urutu* with bactericidal potential, *Toxicon* 115 (2016) 13-21.
29. J.M. Gutierrez, C.L. Ownby, Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity, *Toxicon* 42 (2003) 915-931.
30. V. Moreira, J.M. Gutiérrez, A.M. Soares, S.R. Zamunér, E. Purgatto, C.F. Teixeira, Secretory phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E₂ and D₂ and expression of cyclooxygenases, *Toxicon* 52:(2008) 428-439.
31. N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki, Y. Shibata, H. Takiguchi, T. Iwasawa, Y. Abiko, Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin-1 β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.* 74 (1995) 1382-1388.
32. R.C. Pallotta, J.M. Bjordal, L. Frigo, E.C. Leal Junior, S. Teixeira, R.L. Marcos, L. Ramos, F.M. Messias, R.A.B. Lopes-Martins, Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation, *Lasers Med Sci* 27 (2012) 71-78.
33. F.P. Carlos, M.P.A. Silva, E.L.V.S. Melo, M.S. Costa, S.R. Zamuner, Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis, *Lasers Med. Sci.* 29 (2014) 757-763.
34. A.C. Alves, R. Vieira, E. Leal-Junior, S. Santos, A.P. Ligeiro, R. Albertini, J.A. Silva Jr, P.T.C. Carvalho, Effect of low-level laser therapy on the expression of

- inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 15 (2013) R116.
35. C.H. Golias, E. Tsoutsi, A. Matziridis, P. Makridis, A. Batistatou, K. Charalabopoulos, Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease, *In Vivo* 21 (2007) 757-770.
36. Y. Wang, X. He, D. Hao, D. Yu, J. Liang, Y. Qu, D. Sun, B. Yang, K. Yang, R. Wu, J. Wang, Low-level laser therapy attenuates LPS-induced rat mastitis by inhibiting polymorphonuclear neutrophil adhesion, *J. Vet. Med. Sci.* 76 (2014) 1443-1450.
37. J.C. Villalobos, R. Mora, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, Y. Ângulo, Cytotoxicity induced in myotubes by Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium, *Toxicol. In Vitro* 21 (2007) 1382-1389.
38. D.M. Dourado, S. Fávero, V. Baranaukas, M.A. Cruz-Hofling, Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom, *Lasers Surg. Med.* 33 (2003) 352-357.
39. M. Cintra-Francischinelli, P. Caccin, A. Chiavegato, P. Pizzo, G. Carmignoto, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, C. Montecucco, *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 14140-14145.

5.1 **Figure legends**

Fig. 1 –LLL irradiation attenuates BthTX-I-induced mouse paw edema. Mice were injected with BthTX-I (0.4 mg/kg) in the right paw and in some animals LLL irradiation was applied 30 min and 3 h after myotoxin injection (arrows). Changes in paw volume (edema) were measured by plethysmometry and expressed as the percent change relative

to the contralateral (control) paw. The points represent the mean \pm SEM of 5 mice.

* $p < 0.05$ compared to control and # $p < 0.05$ compared to BthTX-I without irradiation.

Fig. 2 - LLL irradiation attenuates the BthTX-I-induced influx of peritoneal

leukocytes. BthTX-I (1.6 mg/kg) or control was injected into the peritoneal cavity of mice and cell migration was assessed 6 h later. A – Total number of leukocytes, B – Number of polymorphonucleares (PMN) cells and C – Number of mononuclear (MN) cells. The columns represent the mean \pm SEM (n = 5). * $p < 0.05$ compared to control and # $p < 0.05$ compared to BthTX-I without irradiation.

Fig. 3. LLL irradiation attenuates BthTX-I-induced PGE₂ production in mouse

peritoneal cavity. Mice were injected i.p. with BthTX-I (1.6 mg/kg) or control and the PGE₂ concentration in peritoneal exudates was measured by EIA 1 h, 3 h and 6 h later. The columns represent the mean \pm SEM (n= 4-5). * $p < 0.05$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to BthTX-I without irradiation; $\phi p < 0.05$ compared to BthTX-I 3 h.

Fig. 4. BthTX-I decreases the viability of C2C12 muscle cells . C2C12 muscle cells

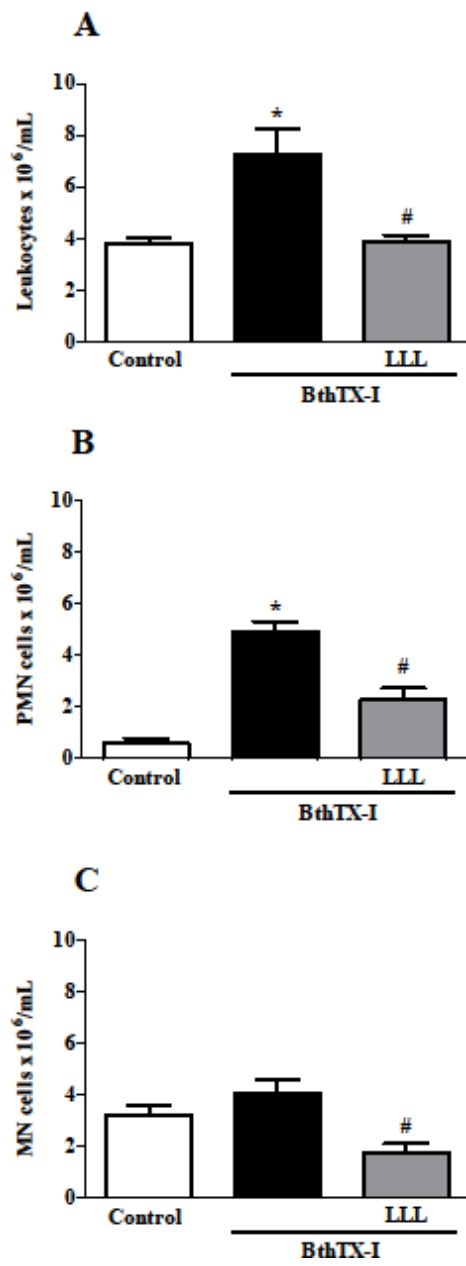
were seeded in 96-well plates and allowed to adhere for 24 h, after which BthTX-I (10, 25, 50 and 75 $\mu\text{g/mL}$) or medium alone (control) was added for 15 min, 30 min and 60 min. Cell viability was determined by the MTT assay. The columns represent the mean \pm SEM (n = 3 independent experiments). * $p < 0.05$ compared to control cells, # $p < 0.05$ compared to 10 $\mu\text{g/mL}$ and $\phi p < 0.05$ compared to 50 $\mu\text{g/mL}$.

Fig. 5. LLL irradiation attenuates the BthTX-I-induced loss of viability in C2C12

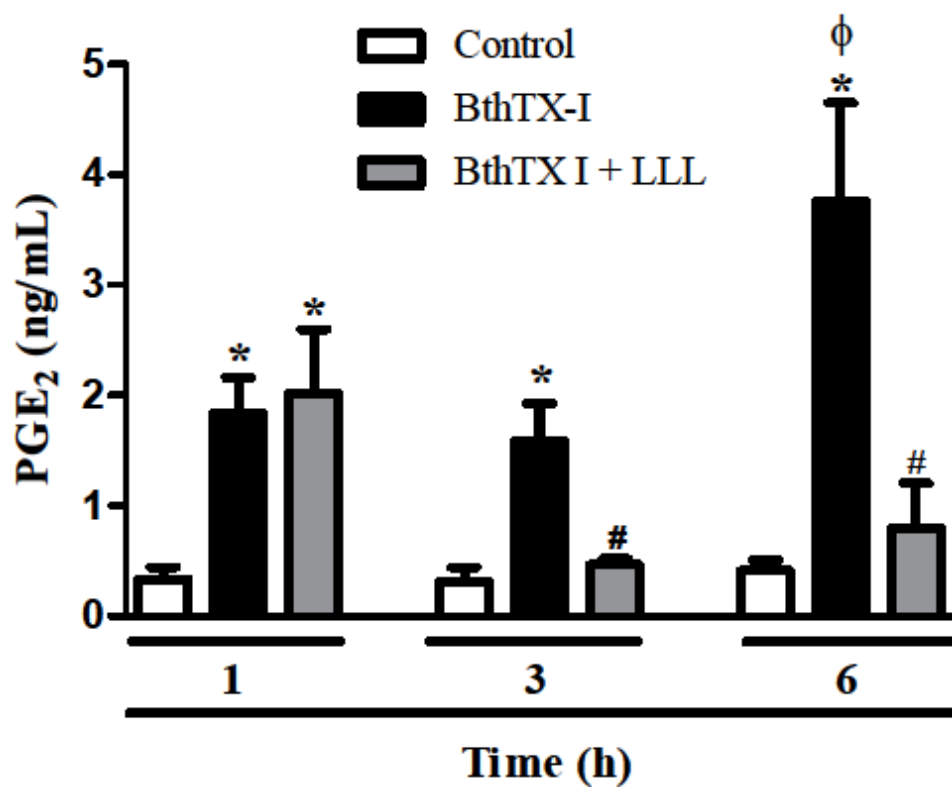
cells. C2C12 muscle cells were seeded in 96-well plates and allowed to adhere for 24 h after which BthTX-I (75 $\mu\text{g/mL}$) was added and the cells then immediately irradiated (4.6 J/cm²). Control cells were incubated with medium alone, medium + irradiation (negative control for irradiation - LLL) or BthTX-I alone (positive control). Cell viability was determined by the MTT assay 15 min, 30 min and 60 min after irradiation. The columns

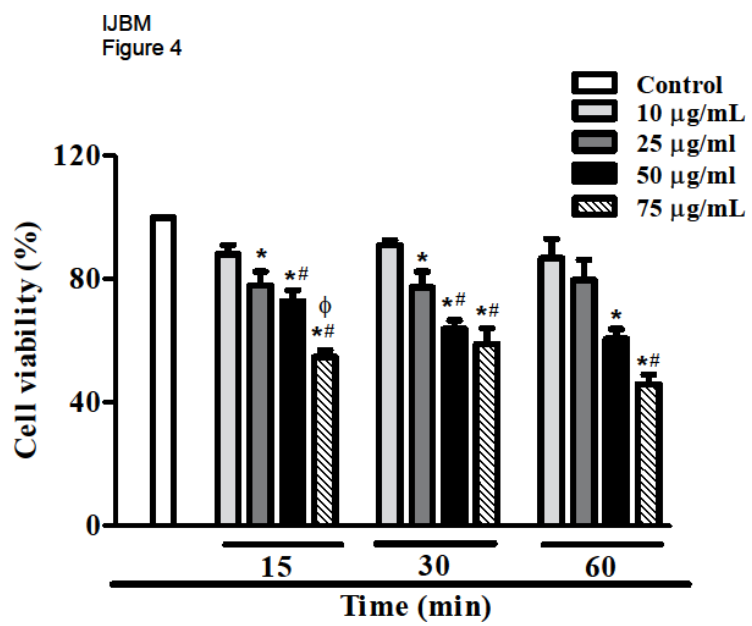
represent the mean \pm SEM (n= 3 independent experiments). *p<0.05 compared to saline and LLL and #p<0.05 compared to BthTX-I without irradiation.

IJBM
Figure 2



IJBM
Figure 3





IJBM
Figure 5

