



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA

---

**Viviane Almeida Gouveia**

---

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE  
SOBRE CÉLULAS MUSCULARES  
SUBMETIDAS À AÇÃO DO VENENO DE  
SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*:  
MECANISMO DE MORTE CELULAR**

São Paulo

2018

---

Viviane Almeida Gouveia

---

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE  
SOBRE CÉLULAS MUSCULARES  
SUBMETIDAS À AÇÃO DO VENENO DE  
SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*:  
MECANISMO DE MORTE CELULAR**

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de  
Mestre em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

São Paulo

2018

Gouveia, Viviane Almeida.

Efeito do laser de baixa intensidade sobre células musculares submetidas à ação do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*: mecanismo de morte celular. / Viviane Almeida Gouveia. 2018.

71 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stella Regina Zamuner.

1. Células musculares. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Apoptose. 4. Necrose.

I. Zamuner, Stella Regina. II. Título

CDU 616

São Paulo, 05 de junho de 2018.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

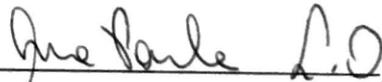
Aluna: VIVIANE ALMEIDA GOUVEIA.

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa intensidade sobre células musculares submetidas à ação do veneno de serpentes do gênero Bothrops: mecanismo de morte celular".

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. ANA PAULA LIGEIRO



Membro: PROF. DR. CARLOS ALBERTO DA SILVA



À minha mãe, que abraça meus sonhos e me dá estrutura.

À minha avó, meu espelho de força e determinação.

Ao meu avô, meu anjo da guarda e sempre minha melhor lembrança.

Como não ser grata a um Deus tão bom?! Agradeço à Ele todos os dias, por todo o meu caminho; por todos os obstáculos e por todos os sorrisos. Nem sempre foi fácil, mas Ele e o Espírito Santo me deram a força necessária para os momentos difíceis e colocaram na minha vida o essencial para a minha jornada. À Nossa Senhora, minha mãe, que sempre me ampara e intercede por mim. E aos inúmeros santos aos quais eu tanto peço. Fé é algo que nunca vai me faltar e é o motivo pelo qual estou aqui hoje.

Agradeço também à minha família que foi sempre o meu maior incentivo. Aos meus tios, tias, primos... à minha madrinha e ao meu padrinho; à Sandra, Jefferson, Henrique, Kico e Sergio. Minha grande, pequena família que está sempre ao meu lado; obrigada por tanto carinho e pela ajuda constante.

À minha mãe e à minha avó todo o agradecimento do mundo seria pouco, afinal não é fácil passar pela tempestade, mas vocês estiveram sempre ao meu lado e me deram a estrutura necessária para que eu pudesse me dedicar a esse e tantos outros projetos que surgiram nessa caminhada. Essa conquista é muito mais do que minha, é totalmente de vocês, que se doaram para os meus sonhos. Agradeço por entenderem todas as vezes que eu parei o mundo para poder estudar e aprenderem a lidar com meu nervosismo quando algo não ia bem. Obrigada por sorrirem os meus sorrisos e sempre me fazerem tão bem. Sou grata também ao meu anjo da guarda, meu avô. Com certeza nada disso seria possível se não fosse ele que de algum modo está ao meu lado sempre e é minha fonte de amor e inspiração. Se não fosse seu legado com certeza eu não estaria aqui hoje, se não fosse seu amor, seus princípios e sua alegria constante. Eu amo MUITO vocês e nada disso seria possível sem vocês ao meu lado!

Ao meu pequeno príncipe Nick pelos lambeijos e alegria constante ao me ver; é tão bom ter sua companhia e seu carinho silencioso sem explicação.

Aos meus amigos queridos agradeço por estarem comigo, principalmente à Bianca Troncarelli que seguiu firme comigo nessa jornada e ao Lucas Barnabé que é meu escape, meu ar e a melhor fonte dos meus sorrisos.

Aos meus colegas de profissão e também amigos, agradeço pela paciência nos momentos difíceis e pelo apoio contínuo. À família Laboratório Central, que é minha fonte de alegria diária, todo o agradecimento do mundo

seria pouco e, em especial ao Armando Morales, à quem eu devo tanto, muito obrigada pela confiança e pela amizade. À Katiane Santin que acompanhou o início da minha vida acadêmica na pós-graduação e a quem eu sempre recorro. Ao Kadri que foi meu maior incentivador. Ao José Luiz Rizzo por todo apoio. Ao Dr. Carlos Eduardo Ferreira e Dra. Antonia Machado por acreditarem no meu trabalho e serem pessoas tão especiais, além de excelentes profissionais que me inspiram; eu tenho muita sorte por trabalhar com pessoas como vocês. Com certeza não citei todos, mas sou grata a cada um que foi em algum momento a palavra doce que eu precisava ou a dura que me fez crescer.

Às pessoas que conheci ao longo do caminho, à Vera Rigone, Danila Marques, Luciana Miato, Aline, Giovanni, Anderson, Lucas, Kaline, Tainá, Nayá, Eduardo, Auriléia, Caren, Adriano, Marcelo, Fernando, Profa. Dra. Cida Dalboni e tantos outros; professores e amigos, que dividiram comigo esses momentos e contribuíram para o meu crescimento, o meu mais sincero: MUITO OBRIGADA!

Em especial à Vera Rigone que iniciou tudo quando me apresentou para a Profa. Stella; à Danila Marques, que começou comigo o mestrado e que tanto me ensinou, uma pessoa única e uma amiga que sempre estará em meu coração; e à Caren, outra pessoa única no meu caminho, meu anjo da citometria.

E claro, à minha querida professora e orientadora, Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, que me aceitou como aluna e se dedicou para que tudo desse certo. Sou imensamente grata, pois em meio a tantas dificuldades encontrei uma orientadora incrível que foi exatamente a pessoa certa na hora certa. Obrigada por sua paciência, por sua generosidade, por sua simplicidade e por ser uma pessoa tão do bem. Obrigada por dividir comigo seu imenso conhecimento e por ter me ajudado a concluir esse sonho, sendo peça fundamental nesse grande desafio.

Hoje percebo que num piscar de olhos a vida pode mudar; os planos mudam, as pessoas mudam... mas vocês sempre serão parte de mim, da minha jornada e tudo o que carrego em meu coração. Com certeza sou uma pessoa melhor graças a cada um e, por isso, sou imensamente grata à todos e à vida que me presenteou com cada um de vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas, graças à Deus,  
não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* é considerado uma doença tropical negligenciada e frequentemente está associado com manifestações locais graves e complexas; como edema, dor intensa, hemorragia e mionecrose. O tratamento convencional específico para esse agravo é a utilização do soro antiofídico, o qual neutraliza grande parte do veneno circulante, minimizando assim seus efeitos sistêmicos. Porém, sua ação local é reduzida e, com isso, o paciente pode apresentar lesão permanente de tecidos e, em alguns casos, até mesmo a amputação do membro afetado. Assim, buscam-se terapias que possam complementar a ação do soro e minimizar os efeitos locais do veneno. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o laser de baixa intensidade (LBI) aumenta a viabilidade de células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com o veneno de *Bothrops jararacussu* e ainda promove a diferenciação dessas células. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do LBI em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> submetidas à ação dos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* quanto ao seu mecanismo de morte celular (necrose e apoptose). Para tanto, as células foram incubadas com os respectivos venenos e imediatamente irradiadas com LBI no comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 2,5 J/cm<sup>2</sup>, potência de 10 mW, área de 0,045 cm<sup>2</sup> e tempo de aplicação de 20 segundos. As células foram incubadas por 2 horas e, posteriormente, foi realizada a citometria de fluxo para análise da morte celular. Também foi avaliada a viabilidade celular juntamente com a dosagem de mediadores inflamatórios como as interleucinas IL-1 β, IL-6, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α). Nossos resultados mostraram que a aplicação do LBI diminui a morte celular nos diferentes venenos por necrose e apoptose; aumenta a viabilidade celular; diminui a liberação de IL-6 para todos os venenos e de IL-1 β para os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni*, mas não influencia na liberação de IL-10 e TNF-α. Assim, o LBI protege as células musculares contra a ação dos venenos estudados; aumentando a viabilidade celular pela diminuição da morte celular (necrose e apoptose) e minimizando o processo inflamatório.

**Palavras-chave:** células musculares, laser de baixa intensidade, apoptose, necrose, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*.

The envenoming caused by snakes of the *Bothrops* genus is considered a neglected tropical disease and is frequently associated with severe and complex local manifestations; such as edema, intense pain, hemorrhage and myonecrosis. The specific and conventional treatment for this condition is the use of the anti-venom serum, which neutralizes the majority of the circulating venom, thus minimizing its systemic effects. However, its local action is reduced and, therefore, the patient may present permanent tissue damage and, in some cases, even amputation of the affected member. Thus, therapies are sought that can complement the action of the serum and minimize the local effects of the venom. Previous studies in our group have demonstrated that the low level laser (LLL) increases the viability of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> muscle cells incubated with the venom of *Bothrops jararacussu* and further promotes the differentiation of these cells. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of LLL on C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> muscle cells submitted to *B. jararaca*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* venoms for their mechanism of cell death (necrosis and apoptosis). To do so, the cells were incubated with the respective venoms and immediately irradiated with LLL at the wavelength of 660 nm, energy density of 2.5 J/cm<sup>2</sup>, potency of 10 mW, area of 0.045 cm<sup>2</sup> and time of application of 20 seconds. The cells were incubated for 2 hours and then flow cytometry was performed for analysis of cell death. Cell viability was also evaluated along with the dosage of inflammatory mediators such as interleukins IL-1 β, IL-6, IL-10 and Tumor Necrosis Factor α (TNF-α). Our results showed that the application of LLL decreases cell death in the different venoms by necrosis and apoptosis; increases cell viability; decreases the release of IL-6 to all venoms and IL-1 β for the venoms of *B. jararaca* and *B. moojeni*, but does not influence the release of IL-10 and TNF-α. Thus, the LLL protects the muscle cells against the action of the venoms studied; increasing cell viability by decreasing cell death (necrosis and apoptosis) and minimizing the inflammatory process.

**Key words:** muscle cells, low level laser, apoptosis, necrosis, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*.

## Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Número aproximado de espécies de serpentes importantes no contexto médico em todo o mundo. ....	2
<b>Figura 2.</b> Incidência de picada de serpente nas regiões brasileiras no período de 2007 à 2012 nas diferentes estações do ano. ....	4
<b>Figura 3.</b> Representação gráfica da distribuição por gênero de serpentes envolvidas nos acidentes ofídicos de 1990 à 1993. ....	5
<b>Figura 4.</b> Fluxograma de identificação de serpentes de interesse médico. ....	7
<b>Figura 5.</b> Vias de morte celular por apoptose. ....	12
<b>Figura 6.</b> Morte celular por apoptose e necrose. ....	14
<b>Figura 7.</b> Grupos do protocolo experimental. ....	29
<b>Figura 8.</b> Protocolo experimental. ....	31
<b>Figura 9.</b> Compensação da citometria de fluxo. ....	35
<b>Figura 10.</b> Aspectos morfológicos do laser de baixa intensidade (LBI) na viabilidade celular de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> submetidas à ação dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> . ....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na viabilidade celular de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> submetidas à ação dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> . ....	42
<b>Figura 12.</b> Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular para o veneno de <i>Bothrops jararaca</i> . ....	44
<b>Figura 13.</b> Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular para o veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> . ....	46
<b>Figura 14.</b> Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular para o veneno de <i>Bothrops moojeni</i> . ....	48
<b>Figura 15.</b> Comparação entre necrose e apoptose avaliadas por citometria de fluxo. ....	49
<b>Figura 16.</b> Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-1 $\beta$ . ....	50
<b>Figura 17.</b> Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-6. ....	52
<b>Figura 18.</b> Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-10. ....	53
<b>Figura 19.</b> Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ). ....	54

## Quadros/Tabelas

<b>Quadro 1.</b> Distribuição por gênero de serpente envolvido nos acidentes ofídicos de 1990 à 1993, no Brasil. ....	<b>5</b>
<b>Quadro 2.</b> Parâmetros utilizados na aplicação do laser de baixa intensidade (LBI).....	<b>28</b>
<b>Tabela 1.</b> Quadro resumo.....	<b>56</b>

---

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. <i>Bothrops</i> .....	8
1.1. <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> .....	10
2. Morte celular .....	11
3. Mediadores inflamatórios .....	15
4. Soro antiofídico .....	18
5. Laser de baixa intensidade .....	20
<b>Objetivo</b> .....	<b>22</b>
1. Geral.....	23
2. Específico .....	24
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>25</b>
1. Cultura celular da linhagem de mioblastos .....	26
2. Veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	27
3. Laser de baixa intensidade .....	28
4. Protocolo experimental .....	29
5. Viabilidade celular.....	33
6. Análise da morte celular por citometria de fluxo .....	34
7. Dosagem das citocinas celulares por ELISA .....	36
8. Análise estatística .....	38
<b>Resultados</b> .....	<b>39</b>
1. Viabilidade celular.....	40
2. Avaliação da morte celular por necrose e apoptose .....	43
2.1. Efeito do veneno de <i>B. jararaca</i> na morte celular .....	43
2.2. Efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> na morte celular .....	45
2.3. Efeito do veneno de <i>B. moojeni</i> na morte celular .....	47
2.4. Comparação entre necrose e apoptose .....	49
3. Liberação de citocinas celulares.....	50
3.1. Interleucina IL-1 $\beta$ .....	50
3.2. Interleucina IL-6 .....	51
3.3. Interleucina IL-10 .....	52
3.4. Fator de necrose tumoral $\alpha$ .....	53
4. Resultados completos .....	55
<b>Discussão</b> .....	<b>57</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>64</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>66</b>

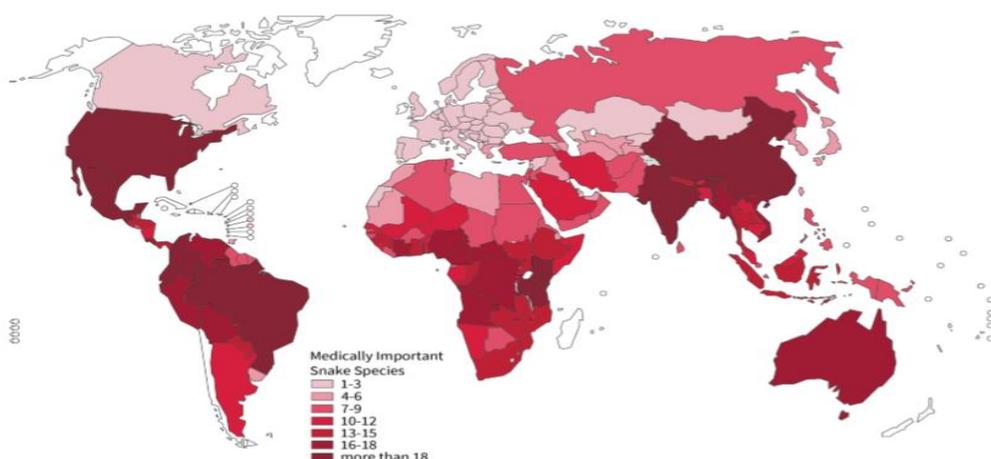
*Introdução*

---

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua última publicação de 2017, após diversas recomendações<sup>(1, 2)</sup>, o envenenamento por picada de serpente é considerado uma Doença Tropical Neglicenciada, pois está entre as doenças que acometem milhões de pessoas em todo mundo, com um custo elevado ao sistema de saúde e que podem ser amenizadas com programas de saúde pública efetivos<sup>(1, 3)</sup>. Ela se enquadra na subclasse de zoonoses negligenciadas onde a transmissão ocorre de um animal vertebrado para o ser humano, sendo necessária uma abordagem multidisciplinar para o seu controle<sup>(4)</sup>.

Dados mundiais da OMS sugerem que acontecem cerca de 5 milhões de acidentes ofídicos por ano em todo mundo, sendo 2,7 milhões ocasionados por serpentes com veneno potencialmente perigoso. Destes, de 81 mil a 138 mil são fatais e aproximadamente 400 mil levam a amputação do membro afetado ou a algum tipo de incapacitação permanente. Acredita-se ainda que esses dados sejam provavelmente maiores, já que muitos acidentes não são notificados por falta de acesso ao sistema de saúde por essas populações, sendo que o grau de subnotificação pode chegar à até 70%<sup>(5)</sup>.

Embora existam cerca de 3.000 espécies de serpentes em todo o mundo, apenas 250 são consideradas de importância médica pela OMS, atingindo em torno de 160 países (**Figura 1**), principalmente áreas rurais afastadas dos grandes centros e países tropicais ou subtropicais<sup>(5)</sup>.



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

Assim, cerca de 95% dos acidentes acontecem em países tropicais ou em desenvolvimento, sendo as regiões mais acometidas pelos acidentes ofídicos o Sul e Sudeste Asiático, África Subsaariana e Américas Central e do Sul. Porém, observa-se uma menor letalidade dos acidentes ofídicos nas Américas, provavelmente por tratamentos mais efetivos nessas regiões com o desenvolvimento de soros anti-ofídicos específicos para o veneno das serpentes de maior incidência<sup>(6)</sup>.

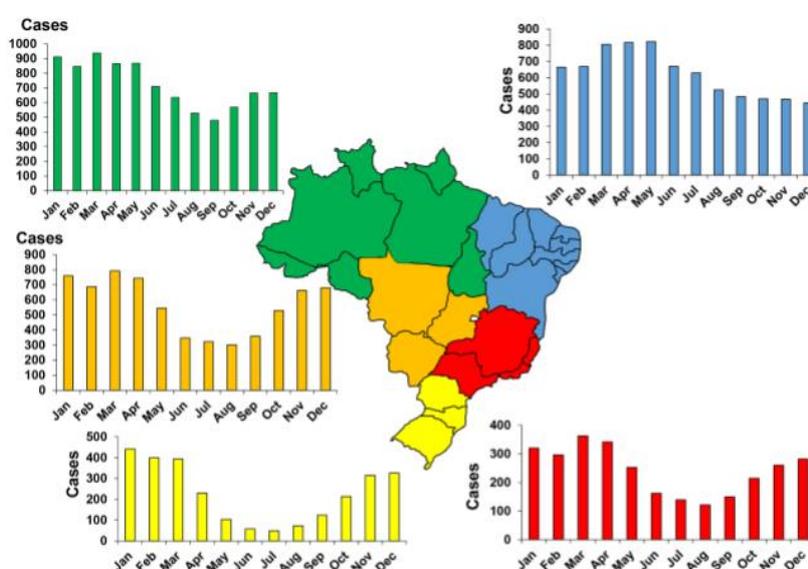
Na América do Sul as principais espécies de serpentes com importância médica são da família *Viperidae*, entre elas: *Bothrops alternatus*, *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Bothrops bilineatus*, *Bothrops brazili*, *Bothrops diporus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops pictus*, *Bothrops venezuelensis*; *Crotalus durissus*; *Lachesis muta*. Destas, as espécies brasileiras que possuem maior importância médica devido a sua alta prevalência, morbidade e mortalidade são: ***Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops atrox*, *Bothrops leucurus*** e *Crotalus durissus*. Existem também outras espécies no território brasileiro que apesar de possuírem alta morbidade e mortalidade são encontradas com menos frequência devido ao seu comportamento, habitat, entre outros fatores e, portanto, causam menos acidentes. São exemplos a família *Elapidae* com as espécies *Micrurus corallinus*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus spixii*, *Micrurus surinamensis*, *Micrurus spp.*; e a família *Viperidae*: *Bothrocophias hyoprora*, *Bothrocophias microphthalmus*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops bilineatus*, *Bothrops brazili*, *Bothrops diporus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops pubescens*, *Bothrops taeniatus*, *Bothrops spp.*; *Lachesis muta*<sup>(7)</sup>.

No Brasil, através da Portaria número 2.472, de 31 de agosto de 2010, o Ministério da Saúde inclui na lista de doenças de notificação compulsória os acidentes com animais peçonhentos, como cobras, escorpiões e aranhas<sup>(8)</sup> e mantém até a sua última atualização, na Portaria número 204, de 17 de fevereiro de 2016, que acidentes por animais peçonhentos são agravos de notificação compulsória imediata, ou seja, o profissional de saúde que atender o paciente acometido por qualquer acidente envolvendo animais peçonhentos, como as serpentes, deve informar a Secretaria Municipal de Saúde em até 24 horas após

a ocorrência desse agravo, seja no sistema público ou privado de saúde, através do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Devem ser notificados todos os casos confirmados de pacientes com evidências clínicas específicas de envenenamento por animal peçonhento, independente da identificação do animal causador<sup>(9)</sup>.

Atualmente, segundo o Ministério da Saúde, com dados de 2016 do SINAN, acontecem cerca de 26 mil casos de ofidismo em todo o Brasil, sendo que destes aproximadamente 15 mil são registrados nas regiões norte e nordeste. Com relação a incidência, para cada 100 mil habitantes, ocorrem cerca de 49 casos na região norte, seguido de 18 na região centro-oeste, 12 no nordeste, 8 na região sul e 6 na sudeste. O número de óbitos também é maior nas regiões norte e nordeste, 38 e 39 respectivamente no ano de 2016, 19 na região sudeste, 15 na centro-oeste e 5 no sul do país, totalizando 116 mortes por ofidismo em todo o território brasileiro no ano de 2016<sup>(10)</sup>.

Além da variação na incidência dos acidentes ofídicos de acordo com a região do país, também podemos ver características sazonais na ocorrência desses agravos, onde os meses de novembro a abril apresentam maior número de casos, como pode ser demonstrado na **Figura 2** a seguir de Jean-Philippe Chippaux<sup>(11)</sup>.



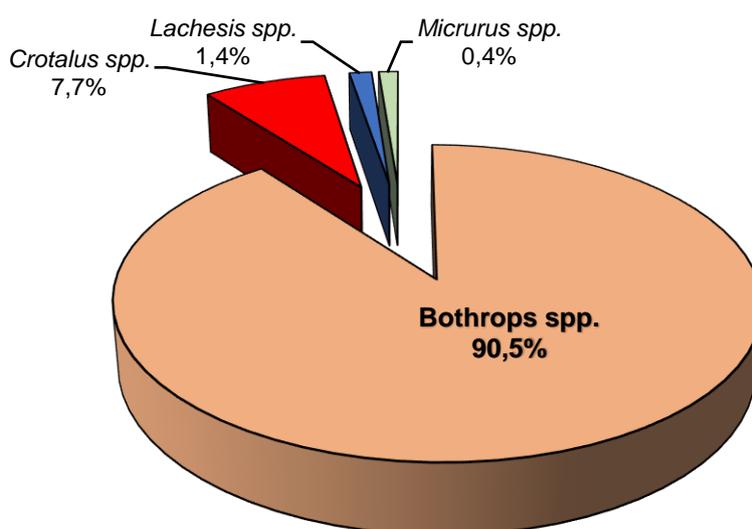
**Figura 2.** Incidência de picada de serpente nas regiões brasileiras no período de 2007 à 2012 nas diferentes estações do ano; segundo Chippaux, 2017.

Dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) mostram que o maior número de casos de acidentes ofídicos no país ocorrem por envenenamento da serpente do gênero *Bothrops*, seguida da *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, como representado no **Quadro 1** a seguir<sup>(12)</sup>:

	Número de Acidentes	%
<b><i>Bothrops</i></b>	59619	73,1
<b><i>Crotalus</i></b>	5072	6,2
<b><i>Lachesis</i></b>	939	1,1
<b><i>Micrurus</i></b>	281	0,3
<b>Não informado</b>	13339	16,3
<b>Não peçonhento</b>	2361	3,0

**Quadro 1.** Distribuição por gênero de serpente envolvido nos acidentes ofídicos de 1990 à 1993, no Brasil; segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001.

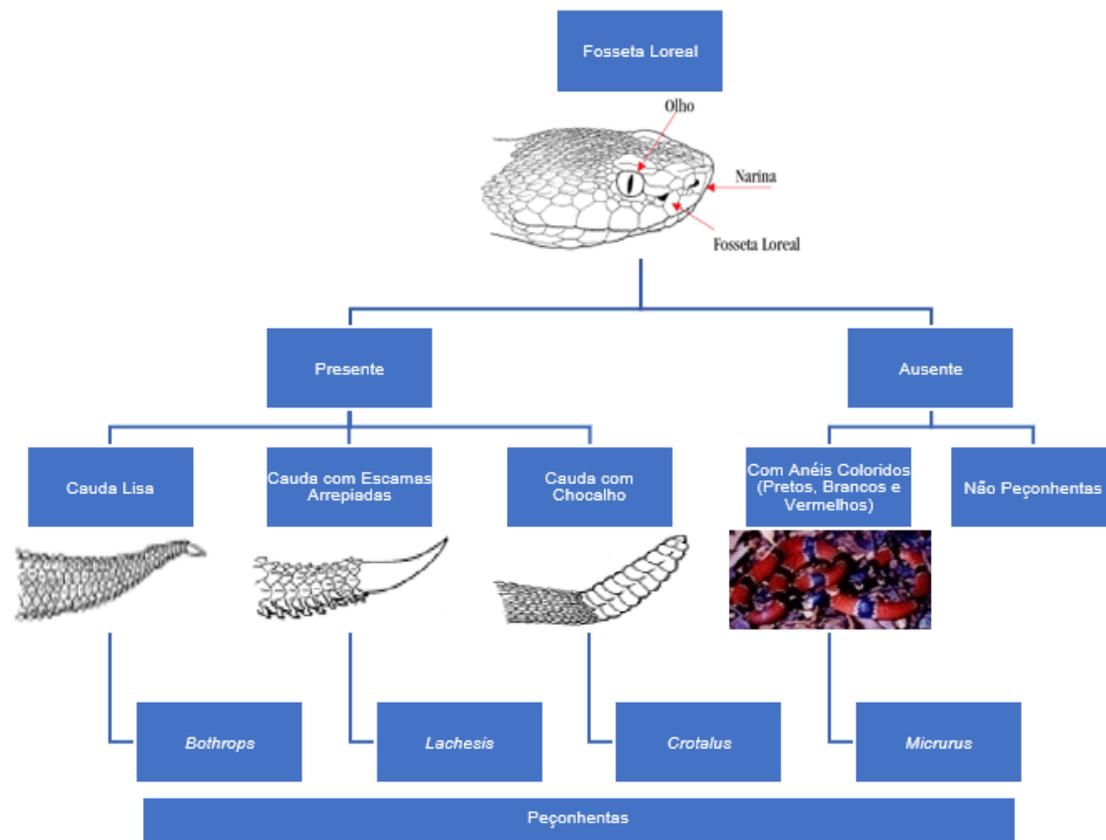
Assim, temos também a representação gráfica (**Figura 3**), mostrando claramente o maior envolvimento das serpentes do gênero *Bothrops* nos acidentes ofídicos brasileiros desconsiderando as serpentes que não foram identificadas e as não peçonhentas, segundo os mesmos dados da FUNASA<sup>(12)</sup>.



**Figura 3.** Representação gráfica da distribuição por gênero de serpentes envolvidas nos acidentes ofídicos de 1990 à 1993, no Brasil, considerando apenas serpentes identificadas; segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001.

O local do corpo onde o maior número de pacientes foi atingido pela picada de serpente foi o membro inferior (pé e perna), com cerca de 70% dos casos de envenenamento notificados. Apenas em cerca de 13% dos pacientes o local atingido foi o membro superior (mão e antebraço), seguido de outras regiões. A maior parte das notificações, aproximadamente 52%, decorrem de acidentes ocasionados em pessoas na faixa etária de 15 à 49 anos e principalmente em homens, que sofrem cerca de 70% dos acidentes. O período diurno é onde ocorre a maior frequência dos casos e afeta geralmente pessoas com força de trabalho ativa que podem sofrer incapacitações permanentes com consequente dano à qualidade de vida do paciente e prejuízos ao sistema público de saúde e previdenciário do país. Muitos acidentes ocorrem também durante o período de trabalho de populações que entram em contato com o habitat natural das serpentes, principalmente populações de áreas rurais, que estão mais expostas ao risco do envenenamento. Assim, sugere-se também que equipamentos de proteção individual, como botas adequadas e luvas de couro poderiam reduzir o número desses acidentes<sup>(12, 13)</sup>.

A identificação da serpente é sempre de fundamental importância, principalmente para que o tratamento ao paciente seja estabelecido de forma adequada, já que com a identificação, acidentes causados por serpentes que não possuem veneno dispensa grande parte dos pacientes do serviço de saúde. Enquanto para acidentes causados por serpentes peçonhentas deve-se fazer a identificação para que o antiveneno administrado seja adequado, uma vez que este é específico para o veneno inoculado pela serpente. A identificação pode ser realizada de acordo com o fluxograma (**Figura 4**) que se segue da FUNASA<sup>(12)</sup>.



**Figura 4.** Fluxograma de identificação de serpentes de interesse médico; segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001.

Também é importante que a ação do veneno seja estudada para que o tratamento seja adequado, gerando menores danos aos pacientes<sup>(12)</sup>, já que os venenos apresentam características muito diversificadas de acordo com o gênero das serpentes e podem gerar tanto reações locais quanto sistêmicas dependendo da sua composição e da quantidade inoculada<sup>(14)</sup>.

Em adição a isso, podem ocorrer diferenças de acordo com variações geográficas, hábitos alimentares ou até mesmo idade de serpentes do mesmo gênero que apresentam características muito semelhantes<sup>(15)</sup>. Assim, muitos autores têm estudado as características específicas de cada veneno, em busca de conhecer a sua complexa composição<sup>(16-19)</sup>.

## 1. *Bothrops*

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* ocasiona como reação sistêmica característica mais comum a hemorragia com hipotensão associada, levando, nos casos mais graves, ao choque hemorrágico. Alguns casos podem também evoluir com insuficiência renal aguda, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade<sup>(15, 20)</sup>. Assim, medicações como o alopurinol, têm sido estudadas para minimizar a insuficiência renal aguda ocasionada nos casos mais graves, com redução do estresse oxidativo e manutenção hemodinâmica renal, juntamente com adequada perfusão do órgão<sup>(15)</sup>. Porém, ainda precisam ser estudadas medidas que diminuam a ação local do veneno, que para o gênero *Bothrops* é a principal reação e a mais importante causa de danos irreversíveis aos pacientes<sup>(16, 21)</sup>.

A reação local do gênero *Bothrops* é caracterizada por uma reação inflamatória bastante intensificada, apresentando edema e dor no local da picada<sup>(16, 21)</sup>, podendo evoluir para necrose do membro afetado até sua amputação, pela ausência de fluxo sanguíneo no local<sup>(20, 22)</sup>.

A composição dos diversos tipos de venenos também apresenta distintas classes de proteínas com diferentes ações que irão produzir a toxicidade e o dano característico de cada envenenamento. O gênero *Bothrops*, por sua vez, apresenta algumas proteínas características de sua toxicidade, como as metaloproteases, fosfolipases, serinoproteases, hialuronidase, L-amino ácido oxidase, lectinas, desintegrinas, entre outras<sup>(23)</sup>. Assim, o veneno dessas serpentes tem três características principais: ação proteolítica, anticoagulante e hemorrágica<sup>(12, 24, 25)</sup>.

Dados da literatura mostram que a mionecrose característica desse gênero é causada por uma família de proteínas denominadas miotoxinas, componentes dos venenos botrópicos, como as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, ligando-se e alterando essa membrana<sup>(26, 27)</sup>. Essas miotoxinas induzem o dano tecidual proeminente, de forma que as alterações morfológicas são observadas a partir de 15 minutos de sua injeção<sup>(28)</sup>.

A PLA<sub>2</sub> é encontrada mais em *B. moojeni*, tendo sua maior característica a miotoxicidade<sup>(29)</sup>. As fosfolipases são enzimas cálcio dependentes e além da sua neuro e miotoxicidade, também inibem a coagulação e a agregação plaquetária; estando envolvidas no processo inflamatório do veneno, hipotensão, hemorragia e desenvolvimento do edema. Assim, foi demonstrado que o veneno de *B. jararacussu* tem uma ação hemolítica maior devido aos seus altos níveis de PLA<sub>2</sub>, enquanto o veneno de *B. jararaca* apresenta uma quantidade menor dessa fosfolipase, mas com inúmeras outras proteinases causadoras de inúmeros outros danos. Já, a *B. moojeni* apresenta alta atividade proteolítica, com menor ação hemorrágica, mas contendo altos níveis de PLA<sub>2</sub><sup>(25)</sup>.

As metaloproteases ou metaloproteinases são um dos principais componentes do veneno botrópico, tendo grande responsabilidade por sua ação, principalmente hemorrágica<sup>(18)</sup>. Elas representam cerca de 30% das toxinas presentes nos venenos botrópicos<sup>(30, 31)</sup>, atuando nos distúrbios da coagulação sanguínea característica do veneno, agregação plaquetária, apoptose celular e ação pró e anti-inflamatória<sup>(32-34)</sup>. Assim, com sua atuação no sistema fibrinolítico e indução da apoptose nas células vasculares endoteliais, afetando a agregação plaquetária, elas são classificadas em três grupos (P-I, P-II e P-III), com características estruturais diferentes que influenciam em sua ação<sup>(35)</sup>. Também são responsáveis pela indução da resposta inflamatória com rápida elevação de citocinas, como a IL-6 (Interleucina-6) e o TNF (Fator de Necrose Tumoral)<sup>(36)</sup>. No veneno da *B. jararaca*, por exemplo, podemos encontrar mais de 50% de sua composição contendo metaloproteinases, segundo estudos de proteômica e espectrometria de massa<sup>(29)</sup>.

As serinoproteases são também responsáveis pela característica hemorrágica do veneno, já que atuam em diversos componentes da cascata da coagulação, ativando o sistema fibrinolítico<sup>(25)</sup>.

Outra toxina encontrada em muitos venenos é a hialuronidase, que pode ser responsável pela perda da integridade da matrix extracelular e sua conexão tecidual. Mostrando a diferença entre as espécies das serpentes, no veneno de *B. jararaca* a atividade da hialuronidase foi mais encontrada, enquanto para *B. moojeni* há baixa ação dessa enzima<sup>(29)</sup>.

As L-amino ácido oxidases (LAAOs) podem causar toxicidade por serem catalisadoras de reações que irão aumentar a produção de peróxido de hidrogênio e amônia, por exemplo; podendo estar envolvidas com o processo de apoptose de várias linhagens celulares. Elas também inibem a agregação plaquetária, tendo a ação anticoagulante característica do veneno<sup>(25)</sup>.

Alguns estudos demonstram a existência de uma ação gênica do veneno, que irá aumentar ou diminuir a função intrínseca de alguns genes exacerbando o dano causado pelo veneno, sendo mais de 50% dos genes transcritos do veneno da serpente *Bothrops jararaca* pertencentes a família das metaloproteinasas, tornando o papel destas ainda mais importantes no dano tecidual<sup>(37, 38)</sup>.

### 1.1. *Bothrops jararaca, Bothrops jararacussu e Bothrops moojeni*

Quando comparamos os venenos de *B. jararacussu*, *B. jararaca* e *B. moojeni*, quanto aos seus efeitos, a literatura demonstra que o veneno da serpente *B. jararacussu* evidencia ser menos potente quando comparado com o de outras serpentes do mesmo gênero, seguido do veneno da *B. jararaca*; enquanto a serpente *B. moojeni* apresenta um veneno mais potente e com maior letalidade. Quanto a atividade do bloqueio neuromuscular, a ação dos venenos das serpentes *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. jararaca* são muito semelhantes. Em contraste com a uniformidade geral observada nas atividades neuromusculares dos venenos, existe variação considerável em seus valores de letalidade, sendo mais letais os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni*; enquanto para a serpente *B. jararacussu* é preciso uma maior concentração do veneno para atingir o mesmo efeito letal. O veneno causador de maior mionecrose é o da *B. jararacussu*, seguido da *B. moojeni* e como causador de menor dano muscular está o veneno da *B. jararaca*. Essas diferenças nas ações dos venenos evidencia diferenças também na sua composição<sup>(39)</sup>.

## **2. Morte celular**

Outro efeito do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é a morte celular<sup>(40-43)</sup>. A morte celular é um processo que ocorre de duas formas, uma delas é a apoptose, também conhecida como morte celular programada e a outra é o processo de necrose celular. A apoptose é uma morte celular que ocorre normalmente durante o desenvolvimento para manter a homeostasia e a manutenção das populações celulares. Ela também pode ocorrer após algum estresse celular, sendo além de um processo fisiológico um processo patológico em alguns casos. Já, a necrose é uma morte celular alternativa a apoptose, sendo considerada um processo tóxico onde a célula sofre algum estresse e não é capaz de se recuperar, ocorrendo assim, a fatal morte celular. Ambos os processos, de apoptose ou necrose, podem ocorrer de forma independente ou simultânea dependendo do estímulo e da célula afetada. A necrose também pode ocorrer sequencialmente ao processo de apoptose<sup>(44)</sup>.

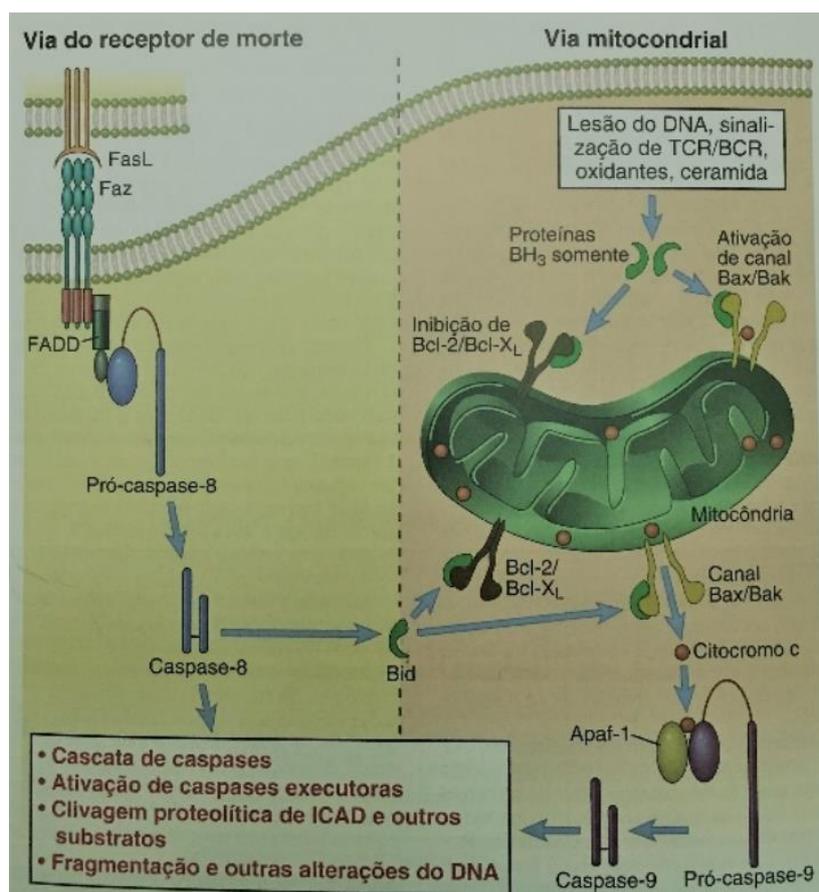
Para que a célula sofra o processo de morte celular por apoptose diversas enzimas na própria célula são ativadas e, então, ocorre a degradação do DNA celular e das proteínas citoplasmáticas. Sua membrana plasmática permanece intacta, mas muda estruturalmente tornando-se alvo para que células fagocitárias, como macrófagos, possam iniciar o processo de fagocitose, com eliminação celular; porém, sem desencadear uma resposta inflamatória. Ela ocorre em diversas situações para eliminar células indesejáveis ou que contenham danos irreversíveis, como danos ao DNA. Sua característica morfológica é o encolhimento celular; com diminuição do tamanho da célula, citoplasma denso e organelas agrupadas. Em seguida, ocorre a condensação da cromatina, rompimento nuclear e formação de bolhas citoplasmáticas, também conhecidas como corpos apoptóticos<sup>(45)</sup>.

A apoptose é induzida por eventos moleculares sequenciais iniciados de diversas formas, mas culminando na ativação das caspases, que são uma família de cisteíno-proteases responsáveis pela clivagem de proteínas celulares vitais. Assim, destroem a estrutura nuclear e o citoesqueleto, e ativam as DNases, enzimas que irão degradar o DNA nuclear, levando à morte celular. As

caspases estão presentes em células normais na forma inativa e precisam ser ativadas através de diversos estímulos para ativar o processo de apoptose<sup>(45)</sup>.

Com a mudança conformacional na membrana celular das células apoptóticas a expressão da fosfatidilserina, que inicialmente estava na parte interna da membrana, passa para camada externa e assim como outras proteínas permitem o reconhecimento dos corpos apoptóticos por células fagocitárias sem a liberação de componentes celulares que possam induzir a inflamação<sup>(45)</sup>.

Existem duas vias que levam a apoptose: a via extrínseca, que é uma morte celular iniciada por receptor, e a via intrínseca ou também conhecida como mitocondrial (**Figura 5**)<sup>(45)</sup>.

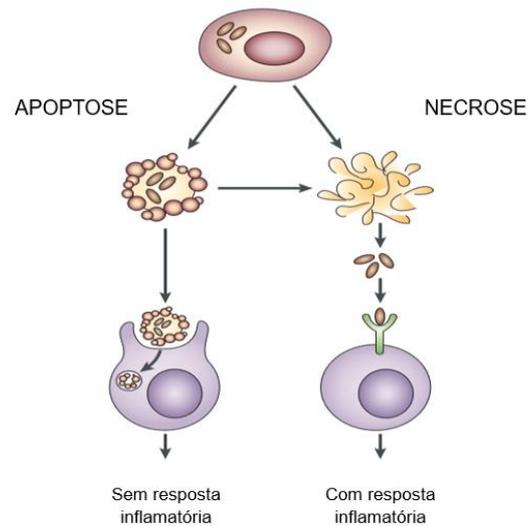


**Figura 5.** Vias de morte celular por apoptose; segundo Abbas *et al.*, 2008, onde a via intrínseca ou mitocondrial é induzida por proteínas específicas que levam ao extravasamento mitocondrial e posterior liberação de proteínas indutoras de apoptose que estão dentro das mitocôndrias. Já, na via extrínseca ou por receptor de morte o receptor em geral da família do TNF desencadeia uma sequência de reações que resulta também da ativação de caspases que levaram a morte celular.

A via extrínseca de apoptose é iniciada pela ativação de receptores celulares presentes nas células, sendo o principal representante desse grupo o receptor de TNF do tipo 1 (TNFR1), que irão ativar diversas proteínas e culminar na ativação das caspases. Já, a via intrínseca, resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma. Células normais possuem proteínas anti-apoptóticas na membrana mitocondrial e no citoplasma, como as Bcl-2 e Bcl-x. Porém, quando as células são expostas a algum estresse perdem essas proteínas, que são substituídas por proteínas da mesma família pró-apoptóticas, como a Bak, Bax e Bim, e então, ocorre um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com extravasamento de diversas proteínas capazes de ativar a cascata das caspases, como o citocromo c<sup>(45)</sup>.

Já, a morte celular por necrose, é caracterizada por ocorrer em decorrência de uma lesão exógena irreversível e, diferente da apoptose, não mantém a integridade da membrana e seu conteúdo extravasa para o meio extracelular, causando inflamação no tecido adjacente. Morfologicamente, a necrose se apresenta com desnaturação das proteínas intracelulares e digestão enzimática da célula, podendo ocorrer após lesões isquêmicas, hipóxia ou lesões químicas letais à célula<sup>(45)</sup>.

A apoptose é então, um processo controlado por diversas vias biológicas e sem resposta inflamatória, enquanto a necrose é um processo imediato, incontrolável e que gera uma resposta inflamatória do organismo<sup>(46)</sup>, como pode ser demonstrado na **Figura 6**<sup>(47)</sup>.



**Figura 6.** Morte celular por apoptose e necrose; segundo Kono e Rock, 2008.

Em geral, o veneno das serpentes *Bothrops* está relacionado com o aumento da apoptose, mas essa é uma característica dose-dependente. Assim, elevados níveis do veneno podem levar as células a um estágio avançado de apoptose, conhecido também como apoptose tardia, ou mesmo aumento da morte celular por necrose e maior dano tecidual<sup>(48)</sup>.

A apoptose também tem sido intensamente relacionada com maior dano e perda da função renal nos casos mais graves de envenenamento pelo gênero *Bothrops*<sup>(43, 49)</sup>.

### 3. Mediadores inflamatórios

Durante todo processo de dano tecidual no local da picada, diversos mediadores inflamatórios são liberados promovendo o dano local encontrado nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*<sup>(50)</sup>. Esses mediadores inflamatórios, também conhecidos como citocinas, são proteínas secretadas por células do sistema imunológico responsáveis pela ativação de reações imunológicas e inflamatórias. Elas são sintetizadas e secretadas em grande quantidade após determinado estímulo, mas possuem como característica principal serem um evento breve e autolimitado, já que estas não são armazenadas e sua síntese é transitória. Podem também atuar em diversos tipos celulares com ação local ou sistêmica<sup>(51)</sup>.

Assim, alguns desses mediadores, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$  ficam elevados pela ação do veneno no local da picada, mas não são tão expressivos sistemicamente. Já, os níveis da Interleucina 10 (IL-10), ao contrário da IL-6 e do TNF, reduzem com a ação do veneno e sua ação sistêmica é mais expressiva<sup>(50)</sup>.

Também já foi demonstrado a intensa ação aguda do veneno, onde esses mediadores (IL-6, IL-10 e TNF) ficam inicialmente alterados e com o passar do tempo passam a apresentar níveis próximos a normalidade<sup>(52, 53)</sup>. Outro mediador importante é a Interleucina 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), que também vem sendo estudada e encontra-se elevada em processos inflamatórios por envenenamento de picada de serpente<sup>(54)</sup>.

O aumento do influxo leucocitário pela ação do veneno está relacionado ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como a LECAM-1, LFA-1, ICAM-1 e PECAM-1, que são responsáveis pela rolagem, adesão e transmigração de neutrófilos dos vasos para os tecidos em processos inflamatórios, mas também pode estar relacionado ao aumento de mediadores inflamatórios como TNF e IL-6, que agiriam diretamente nessa resposta<sup>(55)</sup>.

O TNF é uma das principais citocinas do processo inflamatório agudo e seu nome deriva da sua identificação original como uma substância presente no

soro capaz de causar necrose tumoral. Ele é produzido principalmente por macrófagos ativados e seus receptores estão presentes em quase todos os tipos celulares. Sua principal função fisiológica é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, tendo extensa ação em células do endotélio vascular e leucócitos, mas também atua nos macrófagos estimulando a secreção de IL-1 e contribuindo para reações inflamatórias locais. *In vitro*, é capaz de induzir a apoptose em alguns tipos celulares. Sua ação, quando exacerbada, pode ter também efeitos sistêmicos, além dos efeitos locais; como indução de febre através de sua ação no hipotálamo, aumento da síntese de proteínas como o fibrinogênio pelos hepatócitos, perda de células musculares e adiposas com sua produção prolongada pela perda de apetite e redução da síntese de lipase. Pode ocasionar queda acentuada da pressão sanguínea pela perda de contratilidade do miocárdio e do tônus da musculatura lisa dos vasos, trombose intravascular pela perda das propriedades anticoagulantes endoteliais normais e queda na concentração da glicose sanguínea pela superutilização de glicose pelo músculo e falha do fígado em repor essa glicose. O TNF é um potente ativador da coagulação e inibe a produção de trombomodulina, um inibidor da coagulação. Assim, baixas concentrações de TNF são responsáveis por uma inflamação aguda, agindo principalmente sobre os leucócitos e células endoteliais. Já, concentrações moderadas desse mediador podem ocasionar efeitos mais sistêmicos da inflamação e quando seus níveis atingem concentrações exacerbadas suas reações também se elevam e causam anomalias relacionadas principalmente ao choque séptico<sup>(51)</sup>.

A IL-1 possui função semelhante ao TNF e atua em conjunto com ele nas respostas imunológicas, sendo produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também por outros tipos celulares como neutrófilos, células epiteliais e endoteliais, podendo ser ativada pelo próprio TNF. Existem duas formas de IL-1; a IL-1  $\alpha$  e a IL-1  $\beta$ , que se ligam aos mesmos receptores e possuem atividade biológica semelhante. Diferente do TNF, a IL-1 não induz a apoptose celular e mesmo em altas doses sistemicamente não é capaz de desencadear o choque séptico, embora possa induzir febre, síntese proteica e mediar a inflamação local agindo nas células endoteliais como o TNF<sup>(51)</sup>.

A IL-6 é também um importante mediador inflamatório e pode ser sintetizada por macrófagos, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células em resposta a microorganismos ou mesmo a outras interleucinas como a IL-1 e o TNF. Ela estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimula a produção de neutrófilos, contribuindo assim, no processo inflamatório agudo<sup>(51)</sup>.

Já, a IL-10 é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas, estando envolvida no controle das reações imunológicas, sendo ela então um mediador inibidor dessas respostas. Também é produzida por macrófagos ativados, mas sua ação é inibir a produção de outras citocinas e minimizar o processo inflamatório<sup>(51)</sup>.

#### 4. Soro antiofídico

O tratamento convencional para o acidente botrópico, assim como para outros envenenamentos causados por picada de serpente, é a soroterapia com o soro anti-ofídico. No Brasil, o soro anti-botrópico, específico para envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, é produzido pelo Instituto Butantan através da hiperimunização de cavalos com um pool de venenos das espécies mais importantes da serpente *Bothrops*, são elas: *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%). Esse soro é capaz de neutralizar mais de 40% da atividade de PLA<sub>2</sub> do veneno botrópico de espécies como a *B. moojeni* e *B. jararacussu*; tendo menor eficiência contra o veneno da *B. jararaca*, por exemplo. Ele também tem baixa efetividade na neutralização da atividade proteolítica das enzimas do veneno. Para *B. jararacussu*, por exemplo, ele é capaz de bloquear apenas 2,5% da atividade proteolítica do veneno<sup>(29)</sup>.

Podemos perceber então, a extensa variação nas composições dos venenos botrópicos e na incapacidade do soro anti-botrópico neutralizar todas as toxinas causadoras de danos<sup>(29)</sup>. A neutralização da atividade neuromuscular, por exemplo, é bastante variável e não tem necessariamente relação com a potência do veneno. O veneno de *B. moojeni*, por exemplo, embora seja um dos mais potentes é bem neutralizado pelo soro anti-botrópico, enquanto o veneno de *B. jararacussu* é fracamente neutralizado. Da mesma forma, o veneno da *B. jararaca* também é bem neutralizado pelo soro anti-botrópico<sup>(39)</sup>.

Assim, o soro anti-botrópico mostra-se efetivo no tratamento contra picada de serpente por reduzir efeitos sistêmicos do envenenamento e com isso diminuir a mortalidade dos pacientes atingidos pelo envenenamento botrópico. Porém, tem menor ou nenhuma efetividade na neutralização dos efeitos locais de miotoxicidade<sup>(39)</sup>, sendo uma terapia eficiente somente quando administrada logo após o acidente<sup>(31)</sup>, já que em geral os danos teciduais causados são extremamente extensos e podem ser irreversíveis mesmo com a administração do soro anti-ofídico que não irá reverter os danos causados já instalados<sup>(56)</sup>.

Embora a terapia com soro anti-ofídico tenha sido utilizada como terapia única nos casos de envenenamento durante muitas décadas, cada vez mais terapias complementares vêm sendo estudadas para que sejam instituídas como um complemento ao soro anti-ofídico, minimizando assim, efeitos que o soro não é capaz de neutralizar. Nesse contexto, existem estudos que demonstram que o soro anti-ofídico pode ser associado a extratos de plantas, componentes do próprio veneno que poderiam ter ação neutralizadora ou mesmo componentes sintéticos que atuem junto ao soro anti-ofídico<sup>(54)</sup>. Exemplo disso é o Crocin, um carotenóide extraído da planta *Crocus sativus* com propriedades anti-oxidantes que pode atuar e minimizar o processo inflamatório comum ao envenenamento por serpente, podendo diminuir mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>(57)</sup>.

Com isso, embora a terapia convencional do anti-soro tenha seus benefícios e efetividade sistêmica, seus efeitos não evitam a atividade local dos venenos botrópicos. Dessa maneira, diversos estudos têm buscado novas terapias, como a fotobiomodulação através do Laser de Baixa Intensidade (LBI) que vem se tornando uma possível alternativa consistente no combate ao dano local ocasionado pelo envenenamento botrópico<sup>(50, 58-61)</sup>. Já foi demonstrado, por exemplo, que o edema produzido pelo envenenamento de *Bothrops* não é reduzido com a administração do soro-antibotrópico, mas com a aplicação do LBI ocorre uma diminuição significativa desse edema<sup>(62)</sup>.

## **5. Laser de baixa intensidade**

A palavra laser é uma sigla que corresponde a “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, a qual significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada por Radiação”. O laser é, então, um dispositivo constituído por substâncias, que podem ser de origem sólida, líquida ou gasosa, responsáveis por produzir um feixe de luz quando excitadas por uma fonte de energia, sendo esse feixe de luz denominado raio laser. Ele pode ser classificado de acordo com sua potência em laser de alta ou baixa intensidade. O laser de alta intensidade é utilizado em procedimentos cirúrgicos, com efeitos térmicos e propriedades de corte, vaporização e hemostasia. Já, o Laser de Baixa Intensidade (LBI) possui ação terapêutica com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação<sup>(63)</sup>.

A ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular. Quando o laser é aplicado nos tecidos, a luz é absorvida por fotorreceptores localizados nas células, sendo capaz de modular as reações bioquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações em cadeia mitocondrial, resultando em alterações nos níveis de ATP celular<sup>(64, 65)</sup>.

O LBI é então, uma forma de fotobiomodulação capaz de induzir atividades biológicas como a migração e a proliferação celular, reparo e regeneração tecidual, assim como diminuição da dor e da inflamação. Embora os mecanismos da ação do laser ainda não estejam completamente elucidados seus efeitos estão baseados na absorção da luz emitida e produção de ATP pela mitocôndria, resultando em diversas sinalizações celulares com a ativação de diversas vias metabólicas<sup>(59)</sup>.

A fotobiomodulação também provou ser uma alternativa complementar interessante e eficiente para o tratamento aos efeitos locais causados pelo veneno, principalmente por meio da capacidade de diminuir os efeitos locais observados, como a mionecrose, inflamação, hemorragia e dor<sup>(60, 66)</sup>. Ainda, foi demonstrado que a fotobiomodulação com LBI aumenta a viabilidade de células

musculares e esse efeito está relacionado ao aumento de fatores miogênicos como a miogenina e MyoD nas células musculares<sup>(51)</sup>.

*In vitro*, já foi demonstrado que o LBI pode diminuir a citotoxicidade causada pelo veneno e aumentar a proliferação celular com aumento da regeneração tecidual<sup>(59)</sup>. Também já foi observado que ele pode diminuir o descolamento de células endoteliais, o que estaria relacionado com a perda da integridade celular e processos hemorrágicos. Assim, o LBI teria um efeito protetor contra a ação do veneno<sup>(67)</sup>.

Ao contrário da soroterapia, o tratamento com LBI, pode ser efetivo mesmo quando os sinais clínicos de lesão local por envenenamento de *Bothrops* já são evidentes e assim, o LBI é capaz então de reverter a ação local do veneno<sup>(60, 68)</sup>.

Já foi demonstrado também que o LBI pode diminuir outros dois principais efeitos do envenenamento por *Bothrops*, o edema e o influxo leucocitário, e assim, minimizar a lesão inflamatória local ocasionada pelo veneno<sup>(61)</sup>. Ele também diminui a lesão do veneno à fibra muscular provavelmente por proteger a membrana plasmática e preservar assim sua integridade, diminuindo a mionecrose causada pelo veneno<sup>(69)</sup>.

Outro achado interessante com relação ao LBI frente ao veneno é que ele pode promover a revascularização celular, diminuindo os danos ao veneno, sendo sua ação ainda mais efetiva se aplicado nas primeiras 72 horas após o envenenamento<sup>(70)</sup>.

Embora alguns estudos tenham demonstrado a eficácia da fotobiomodulação na redução dos efeitos locais induzidos pelo veneno botrópico, o mecanismo envolvido neste processo ainda não está totalmente elucidado<sup>(61)</sup> e com isso, fazem-se necessários novos estudos na tentativa da elucidação dos mecanismos celulares pelos quais o LBI causa essa proteção celular ao veneno.

*Objetivo*

**1. Geral**

Avaliar o efeito do Laser de Baixa Intensidade (LBI) em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> após ação do veneno das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*.

## **2. Específico**

- Avaliar a viabilidade celular frente ao veneno, correlacionando com a interferência do LBI;
- Avaliar o processo de morte celular (apoptose e necrose) causada pelo veneno e a influência do LBI nesse processo;
- Avaliar a produção de citocinas (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) pelas células expostas ao veneno e a ação do LBI nessa liberação.

*Material e Métodos*

---

## **1. Cultura celular da linhagem de mioblastos**

As células utilizadas em nosso estudo foram provenientes da linhagem de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Ernesto Belizário, do Instituto de Ciências Biomédicas - USP/SP. Elas foram cultivadas no meio de cultura DMEM (Dulbecco modification of Minimun Essential Media), que é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular em cultura, sempre em pH = 7,4; comercializado pela Vitrocell, Campinas, SP - Brasil; contendo o acréscimo de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica, contendo penicilina e estreptomicina, comercializados pela Cultilab, Campinas, SP - Brasil.

Elas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Fisher Scientific Inc, Marietta, OH - EUA) à 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY - EUA), sendo o subcultivo realizado quando a monocamada celular se tornou subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular; sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP - Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO 1,4mM; pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos à 37°C. Após a incubação, a tripsina foi neutralizada com meio e seguiu-se a centrifugação à 1.200 rpm à 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP - Brasil).

Foram utilizadas células em passagens diferentes para avaliar a reprodutibilidade do ensaio.

A viabilidade das células foi avaliada através da contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%. A seguir, foram feitas as diluições necessárias para a semeadura das células em placas de cultura de 6 poços.

## **2. Veneno de serpentes do gênero *Bothrops***

Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares adultos de serpentes do gênero *Bothrops*, provenientes do serpentário da Universidade do Vale do Paraíba, fornecidos pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo, sendo eles das espécies *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. Os venenos foram submetidos à liofilização e mantidos a – 20°C até o momento da sua utilização. Eles foram utilizados na concentração de 50 µg/mL para que ocorresse morte celular como já foi demonstrado por nosso grupo (39) e diluídos em meio DMEM.

### 3. Laser de baixa intensidade

O dispositivo laser utilizado foi o laser Twin Flex Premier da MMOptics e os parâmetros utilizados estão descritos no **Quadro 2**.

---

#### **Parâmetros do Laser de Baixa Intensidade**

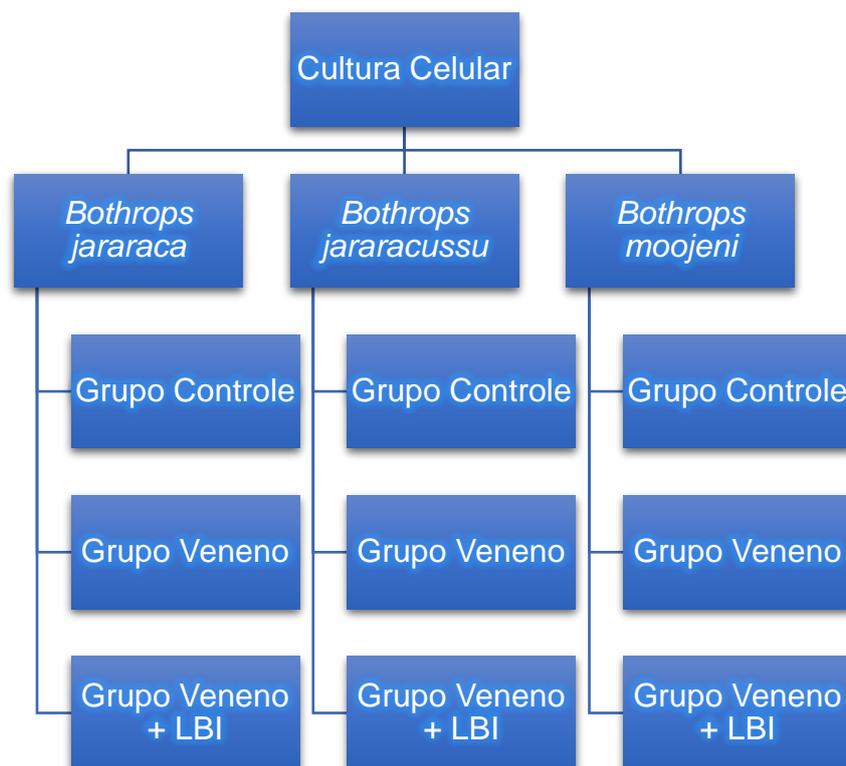
---

<b>Comprimento de onda</b>	660 nm
<b>Densidade de energia</b>	2,5 J/cm <sup>2</sup>
<b>Potência</b>	10 mW
<b>Área</b>	0,045 cm <sup>2</sup>
<b>Tempo</b>	20 segundos

**Quadro 2.** Parâmetros utilizados na aplicação do laser de baixa intensidade (LBI); segundo equipamento Twin Flex Premier, MMOptics.

#### 4. Protocolo experimental

As células foram semeadas  $1 \times 10^6$  células/mL em placas de 6 poços e mantidas em estufa à uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C, por 24 horas para adesão celular. Após esse período as células foram incubadas de acordo com seus grupos, onde o grupo controle foi incubado apenas com meio DMEM, sem ação de veneno ou laser; o grupo veneno foi incubado por 2 horas com os três tipos de venenos separadamente, diluídos em meio DMEM na concentração de 50µg/mL; e no grupo veneno + laser foi aplicado o laser de baixa intensidade (LBI) juntamente com a aplicação do veneno. Sendo assim, foram criados 3 grupos para cada um dos venenos, como representado na **Figura 7**.



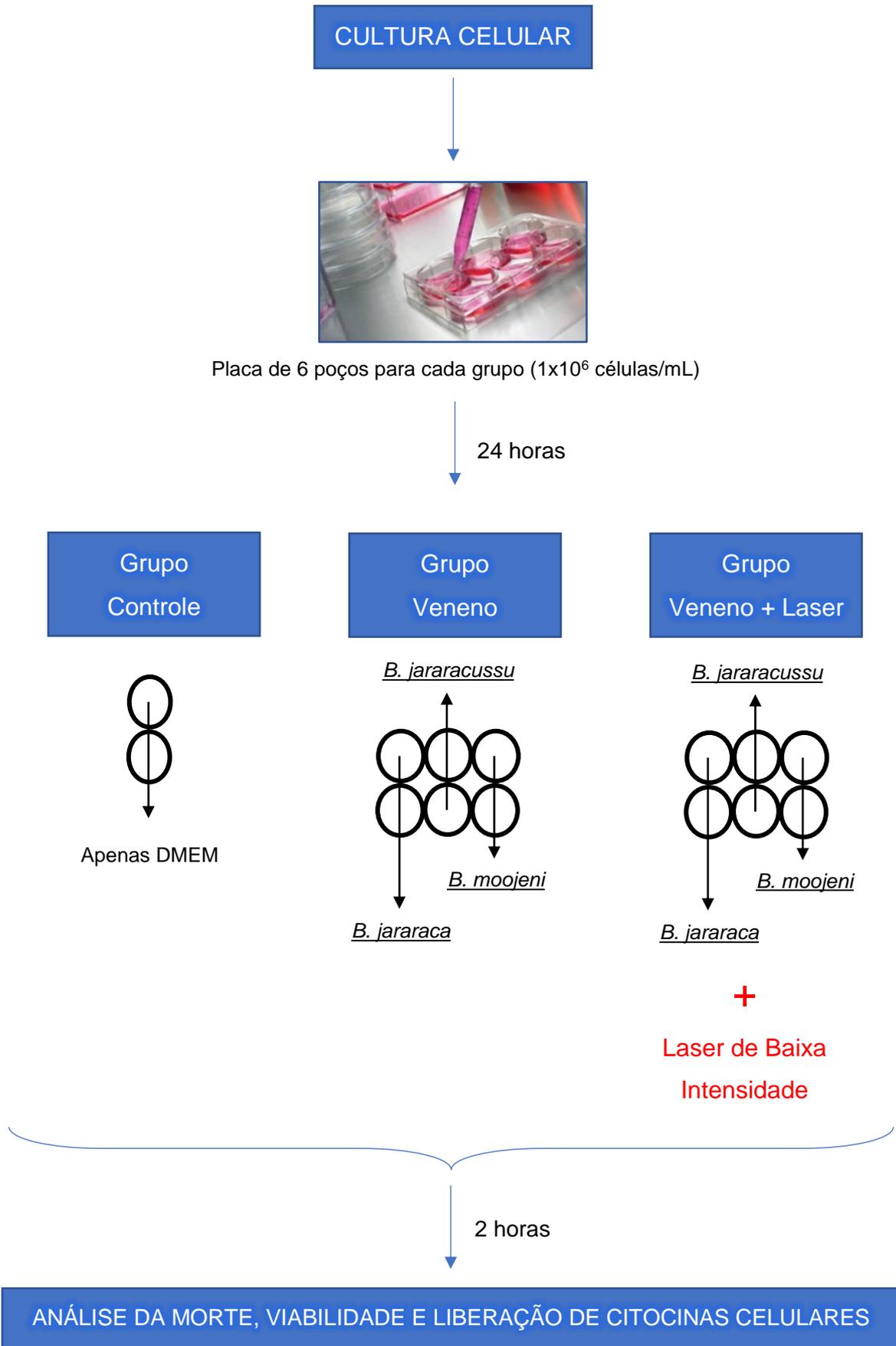
**Figura 7.** Grupos do protocolo experimental; onde o Grupo Controle foi incubado apenas com meio DMEM, o Grupo Veneno foi incubado com seu respectivo veneno e o Grupo Veneno + LBI juntamente com o respectivo veneno foi aplicado o Laser de Baixa Intensidade (LBI).

- Grupo 1: grupo controle, as células não receberam veneno e não foram irradiadas, apenas foram incubadas com meio DMEM;
- Grupo 2: grupo veneno, as células receberam apenas o veneno específico para cada uma das espécies;
- Grupo 3: grupo veneno + LBI, as células receberam o veneno juntamente com a aplicação do laser.

A incubação das células apenas com a aplicação do LBI não se fez necessária pois avaliamos a ação do LBI frente a exposição ao veneno.

Para as células que foram irradiadas imediatamente após a adição do veneno na cultura, a aplicação do LBI ocorreu de forma pontual diretamente no poço e os experimentos foram realizados em fluxo laminar com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa.

Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo repetidos também em dias alternados para verificar a reprodutibilidade do ensaio e dos resultados. Assim, obtivemos uma amostragem de três experimentos ( $n = 3$ ) em duplicata. Foi seguido o fluxograma da **Figura 8**, para realização dos ensaios.



**Figura 8.** Protocolo experimental para análise da morte celular, viabilidade e liberação de citocinas celulares por células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e ação do laser de baixa intensidade (LBI).

Após a incubação de 2 horas, foi realizado primeiramente o ensaio de viabilidade celular descrito a seguir. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante das placas e colocado em falcons identificados. Seguiu-se o processo de centrifugação à 1.200 rpm por 5 minutos à temperatura de 10°C e, em seguida, o sobrenadante do material centrifugado foi transferido para um eppendorf e armazenado em freezer (-80°C) para a análise das citocinas celulares.

A placa que continha as células ainda aderidas foi tratada com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos à 37°C. Após a incubação, a tripsina foi neutralizada com meio e todo o conteúdo foi transferido para o falcon correspondente onde já havia sido centrifugado o sobrenadante referente aquele poço da placa. Seguiu-se novamente a centrifugação a 1.200 rpm por 5 minutos à 10°C. O sobrenadante dessa vez foi desprezado já que era no pellet da primeira centrifugação que estavam as células que haviam sofrido morte celular e, no pellet agregado da segunda centrifugação que estavam as células viáveis que haviam permanecido aderidas na placa e foram previamente tripsinizadas.

Acrescentou-se 500 µL de PBS para lavar e retirar qualquer interferente do meio de cultura à fluorescência e centrifugou-se novamente à 1.200 rpm por 5 minutos à 10°C. Desprezamos o sobrenadante e então, acrescentou-se 1 mL de PBS para a realização do ensaio de citometria, já que para cada amostra foram feitos 4 tubos de citometria com 250 µL de células suspensas em PBS por tubo.

## **5. Viabilidade celular**

Para análise da viabilidade celular após a incubação por 2 horas de todos os grupos observamos as células em microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) e fotografamos 3 campos diferentes de cada grupo e de sua duplicata, totalizando 6 imagens para cada grupo. Em seguida, as células foram contadas através do software ImageJ 1,46r (National Institutes of Health, EUA). A contagem de cada imagem foi realizada duas vezes sem que o observador soubesse qual era o grupo que estava sendo analisado para evitar interferências do observador e então, os dados foram tabulados para análise estatística.

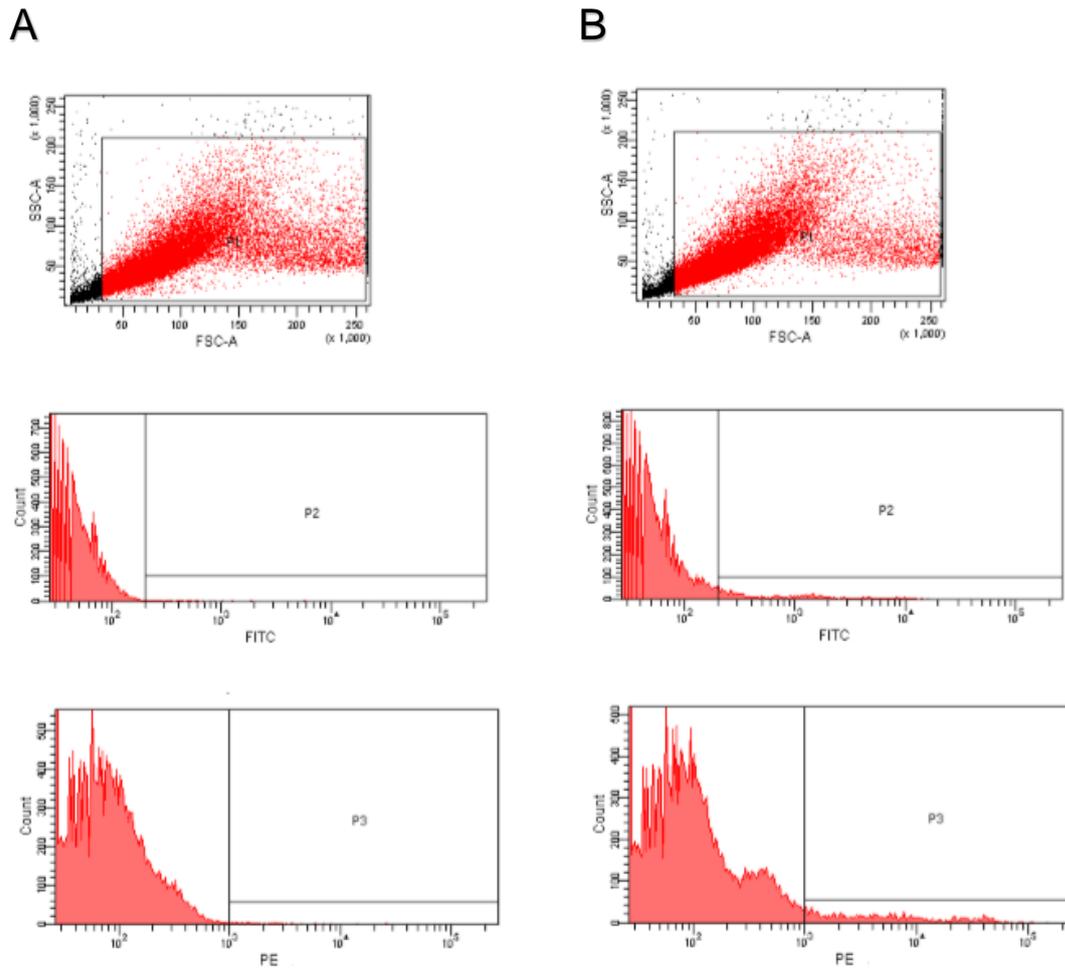
## **6. Análise da morte celular por citometria de fluxo**

A avaliação da morte celular com seus efeitos apoptóticos e necróticos, induzidos pelos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, foi realizada através de citometria de fluxo.

Como marcador de apoptose, utilizamos a Anexina V - FITC. Enquanto para marcação de necrose foi utilizado o Iodeto de Propídio (PI) - PE. Ambas as marcações foram adicionadas na mesma amostra e a fluorescência compensada no citômetro, sendo os marcadores utilizados da EBioscience.

Para a citometria de fluxo, após o protocolo experimental, as células foram transferidas para os tubos de citometria (250 µL) e incubadas com 400 µL de tampão de anexina, 5 µL de anexina V - FITC e 4 µL de PI - PE durante 20 minutos protegidos da luz e em gelo para evitar adesão celular ao tubo.

Para compensação das fluorescências as células (250 µL) também foram incubadas apenas com 400 µL de tampão de anexina para que a fluorescência natural da célula fosse compensada ao passar no citômetro (**Figura 9**). E, para compensação das fluorescências dos marcadores fizemos mais dois tubos, onde um deles continha 400 µL de tampão de anexina, 5 µL de anexina V – FITC e 250 µL de célula; e no outro, 400 µL de tampão de anexina, 4 µL de PI - PE e 250 µL de célula.



**Figura 9. Compensação da citometria de fluxo.** Para o grupo controle, após 24 horas de incubação para adesão celular as células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas por 2 horas apenas com meio de cultura DMEM e em seguida, realizada a citometria. A compensação da citometria foi então realizada utilizando o grupo controle sem nenhuma marcação **(A)** e com os dois marcadores de morte celular por apoptose e necrose: Anexina V – FITC e PI – PE, respectivamente **(B)**. Assim, fluorescências naturais foram eliminadas. No primeiro gráfico está o gate da população de células analisada **(P1)**. No segundo a fluorescência de Anexina V – FITC **(P2)** e no terceiro de PI – PE **(P3)**.

Após realizada a compensação as células marcadas dos grupos estudados foram ressuspensas e passadas no citômetro para aquisição de dados. Foram avaliados um total de 50.000 eventos adquiridos no citômetro FACSCanto™ (BD - EUA). O software utilizado para análise da amostra e aquisição de dados foi o BD FACSDiva v. 8.0.1.

## 7. Dosagem das citocinas celulares por ELISA

A liberação de citocinas pelas células foi avaliada através do ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que é um ensaio imunoenzimático que possui como base metodológica a ligação antígeno e anticorpo, sendo neste estudo utilizado para detecção de IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Kits específicos da BioLegend® (San Diego, CA - EUA) foram utilizados para a realização de cada um desses ensaios, todos com princípios e metodologias semelhantes, apenas com alteração de alguns reagentes, seguindo as recomendações próprias do fabricante.

Assim, placas de 96 poços para realização do ELISA foram incubadas de 2 à 8°C *overnight* com anticorpo de captura indicado em cada kit para adesão na placa. Para cada um dos analitos pesquisados (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) foi feita uma placa com o anticorpo específico para aquele analito.

Em seguida, a placa foi lavada com solução de lavagem e incubada por uma hora com uma solução de bloqueio, ambas específicas do kit.

Foi realizada nova lavagem e então, adicionadas as amostras.

Nessa etapa, as citocinas IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  presentes na amostra vão se combinar com o anticorpo de captura adsorvido aos pocinhos da placa, formando um complexo antígeno-anticorpo após incubação à temperatura ambiente (21-25°C) por 2 horas.

As amostras foram o sobrenadante de cada um dos grupos após a incubação de 2 horas com veneno, com veneno e irradiadas com LBI ou apenas com meio de cultura que haviam sido previamente congelados à -80°C.

Após incubação, as placas de ELISA com as amostras foram lavadas e posteriormente incubadas com o anticorpo de detecção conjugado com biotina a temperatura ambiente por 1 hora.

Em seguida, nova lavagem foi realizada e adicionada solução de avidina conjugada com peroxidase para detecção da formação do complexo anticorpo –

antígeno (IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) – anticorpo, através do último anticorpo colocado conjugado com biotina; e então, a solução de avidina com peroxidase vai se ligar a esse complexo.

Nova incubação é realizada por mais 30 minutos.

Após esse tempo, efetuamos outra lavagem e adicionamos TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina) que é um substrato cromogênico responsável por dar cor a reação proporcional a quantidade do analito pesquisado. A incubação foi de 15 minutos protegida da luz.

Por último foi adicionada a solução de parada que bloqueou a reação e deixou-a estável até a leitura que ocorreu brevemente, dentro de no máximo 15 minutos.

Para cada analito a leitura é realizada em espectrofotômetro (Robonik, Maharashtra - Índia) com um comprimento de onda específico de 450 nm indicado pelo fabricante, e sendo assim, determinada a absorvância de cada amostra.

Para análise dos resultados, juntamente com as amostras é realizada uma curva de calibração que consiste em diluições seriadas de uma amostra com valor conhecido do analito. Em seguida, a curva padrão foi feita e então, no eixo x colocado o valor da concentração da amostra conhecida e suas diluições e no eixo y as absorvâncias encontradas para essas amostras; formando assim a curva que também será utilizada para determinação da concentração das amostras analisadas, sendo a intensidade da cor, determinada pela absorvância, diretamente proporcional a concentração do analito na amostra.

## **8. Análise estatística**

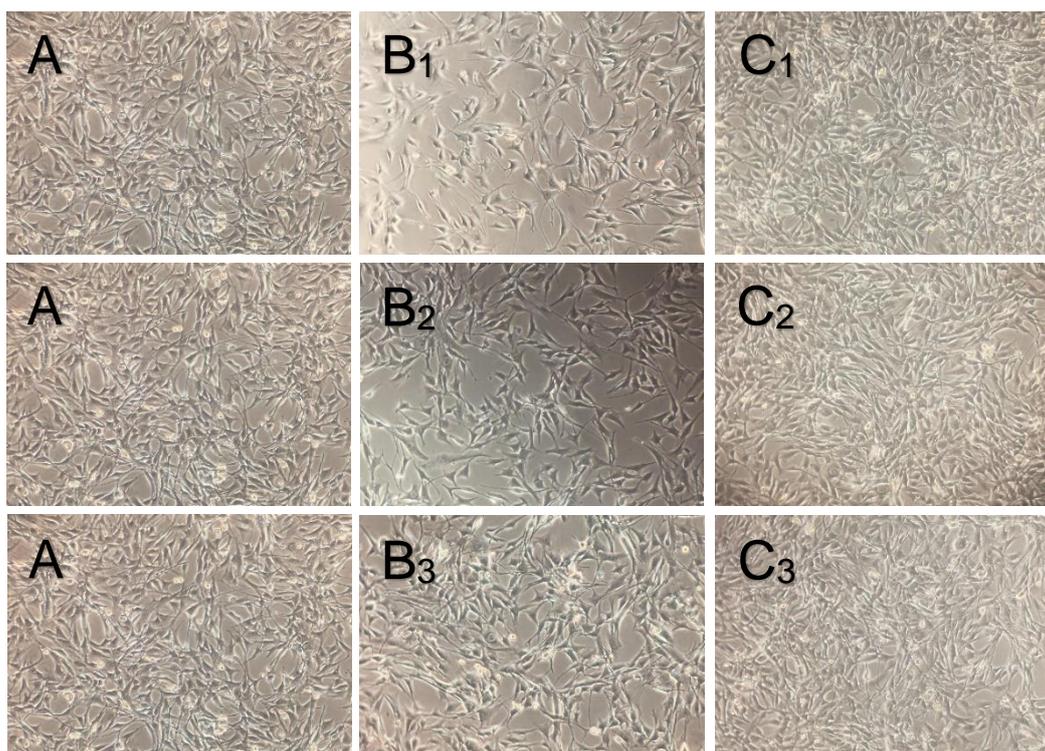
Os dados foram avaliados quanto a sua normalidade e então, expressos em média e erro padrão da média ou *standard error of the mean* (SEM). O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA) com auxílio do software “GraphPad Prism 5.0” (*GraphPad Software*, San Diego, CA - EUA). Foi realizado também o pós teste Tukey e considerados significantes resultados com  $p < 0,05$ .

*Resultados*

---

## 1. Viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi realizada após 2 horas de incubação das células com os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* através da contagem celular em diferentes campos microscópicos e comparação com a contagem obtida nos demais grupos: controle, que foi incubado apenas com meio DMEM, e veneno + LBI, incubado com os respectivos venenos e irradiado imediatamente com o laser de baixa intensidade (LBI). Com relação aos aspectos morfológicos percebeu-se que o grupo veneno apresentava uma quantidade de células menor do que os grupos controle e veneno + LBI, sugerindo até que o grupo irradiado com LBI apresentava um número de células maior do que o grupo controle (**Figura 10**).



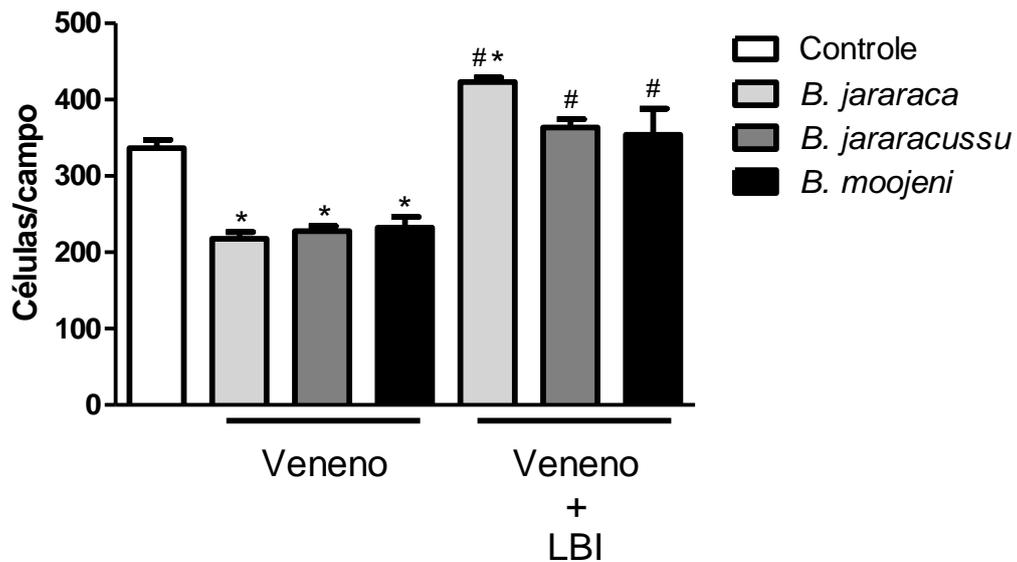
**Figura 10. Aspectos morfológicos do laser de baixa intensidade (LBI) na viabilidade celular de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> submetidas à ação dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. A. Grupo controle, células sem nenhuma intervenção; B<sub>1</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops jararaca*; B<sub>2</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops jararacussu*; B<sub>3</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops moojeni*; C<sub>1</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops jararaca* com a aplicação imediata do LBI; C<sub>2</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops jararacussu* com a aplicação imediata do LBI; C<sub>3</sub>. Células expostas por 2 horas ao veneno de *Bothrops moojeni* com a aplicação imediata do LBI.**

Corroborando o aspecto morfológico, os dados da contagem celular mostraram que os grupos incubados com os diferentes venenos apresentaram uma viabilidade celular inferior, com uma contagem de células baixa, indicando a morte celular ocasionada pelo veneno. Para o veneno de *B. jararaca* o número médio de células encontrado foi de  $217,8 \pm 8,6$  células/campo. Enquanto para *B. jararacussu* foi de  $227,7 \pm 6,5$  células/campo e para *B. moojeni* foi de  $232,3 \pm 14,06$  células/campo (**Figura 11**). Comparando com o grupo controle, que teve uma contagem de  $336,3 \pm 10,9$  células/campo, foi obtida uma diferença significativa entre os grupos com  $p < 0,05$  e assim o grupo controle apresentou maior viabilidade celular (**Figura 11**), mostrando a efetiva ação do veneno na diminuição da viabilidade celular e consequente morte celular.

Já, o grupo veneno + LBI de todos os venenos estudados, mostrou-se significativamente diferente do grupo que foi incubado apenas com os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, apresentando uma viabilidade celular maior e indicando que o LBI neutraliza os efeitos tóxicos dos venenos (**Figura 11**). Para o grupo veneno + LBI da *B. jararaca* a contagem celular foi de  $423,3 \pm 5,6$  células/campo, para *B. jararacussu* foi de  $363,6 \pm 10,9$  células/campo e para *B. moojeni* foi de  $353,8 \pm 34,3$  células/campo.

Para o veneno de *B. jararaca* observou-se também que houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo veneno + LBI, com maior viabilidade celular no grupo do veneno que foi irradiado com o laser, sugerindo assim uma proliferação celular pelo uso do LBI (**Figura 11**).

Observou-se também que não houve diferença entre os grupos dos venenos e assim, todos os venenos apresentaram ações parecidas com relação a viabilidade celular (**Figura 11**).



**Figura 11. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na viabilidade celular de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> submetidas à ação dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*.** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas em placas de 6 poços por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno (50 µg/mL) a um dos grupos e no outro além do veneno as células foram imediatamente irradiadas com LBI; ambos os grupos foram incubados por 2 horas. O grupo controle foi incubado apenas com meio de cultura DMEM. A viabilidade celular foi realizada pela contagem das células em diferentes campos microscópicos, sendo o ensaio realizado em duplicata. Cada valor representa a média ± SEM das contagens celulares, sendo o teste Anova com Tukey utilizado para os testes estatísticos; com significância igual à \* p < 0,05 em relação ao grupo controle e # p < 0,05 em relação ao grupo veneno.

## 2. Avaliação da morte celular por necrose e apoptose

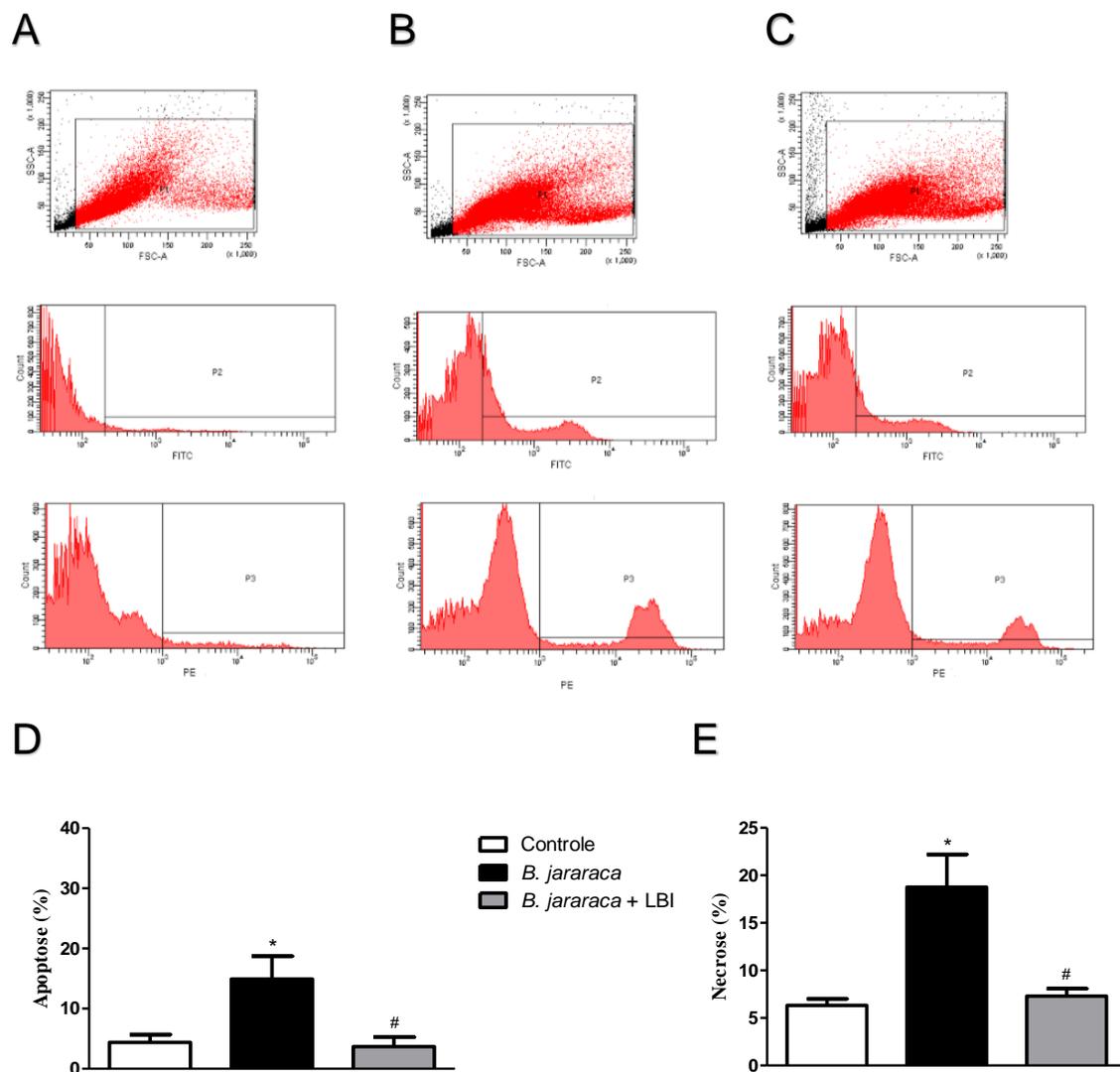
As mortes celulares, por necrose e apoptose, foram avaliadas através do ensaio de citometria de fluxo, onde as células não viáveis em estágios necróticos são marcadas com Iodeto de Propídio (PI) e células em apoptose são marcadas com Anexina V.

### 2.1. Efeito do veneno de *B. jararaca* na morte celular

As células da linhagem de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas com o veneno de *B. jararaca*, na concentração de 50 µg/mL, por 2 horas, e então, foi realizada a citometria de fluxo, como podemos observar na **Figura 12**. Os resultados gráficos da citometria são demonstrados na **Figura 12A, B e C**, onde **A** representa o grupo controle, **B** o grupo incubado apenas com veneno e **C** o grupo com veneno e irradiado com LBI no mesmo momento. Os gates **P1, P2 e P3**, demonstrados na mesma figura, são a população de células avaliada, as células marcadas com Anexina V – FITC indicando apoptose e as células marcadas com PI – PE indicando necrose; respectivamente.

Os resultados demonstraram aumento estatisticamente significativo na porcentagem de morte celular por apoptose (14,9 % ± 3,8) causada pelo veneno quando comparado ao grupo controle (4,4 % ± 1,3), como demonstrado na **Figura 12D**. Da mesma forma, quando foi avaliada a morte celular por necrose houve um aumento significativo do grupo veneno (18,7 % ± 3,4) em relação ao controle (6,3 % ± 0,7), como pode ser observado na **Figura 12E**.

Também pode ser constatado que o tratamento com o LBI reduziu significativamente a morte celular causada tanto por apoptose (3,7 % ± 1,6) quanto por necrose (7,3 % ± 0,7) para o veneno de *B. jararaca* (**Figura 12D e E**, respectivamente), deixando o grupo veneno + LBI semelhante ao grupo controle.



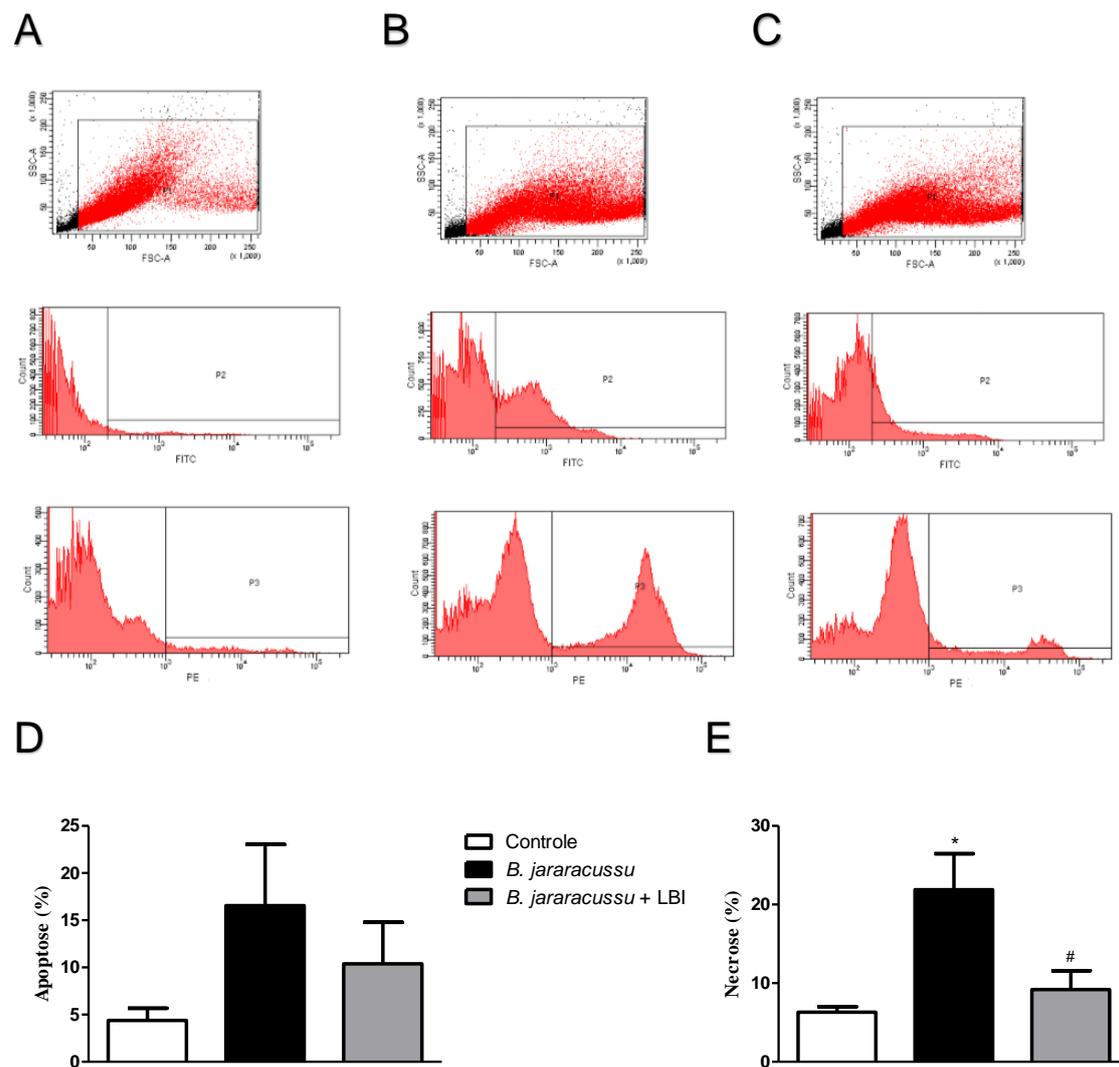
**Figura 12. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular para o veneno de *Bothrops jararaca*.** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas em placas de 6 poços por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno (50 µg/mL) ao grupo veneno e no grupo veneno + LBI além do veneno as células foram imediatamente irradiadas com LBI; ambos os grupos foram incubados por 2 horas e, em seguida, realizada a citometria de fluxo. Como grupo controle foram utilizadas células incubadas apenas com meio de cultura DMEM. **(A)** Citometria do grupo CONTROLE. **(B)** Citometria do grupo VENENO. **(C)** Citometria do grupo VENENO + LBI. Nos primeiros gráficos **(A, B e C)** está o gate da população de células analisada **(P1)**. Em seguida, a fluorescência de Anexina V – FITC **(P2)** e de PI – PE **(P3)**, representando as mortes celulares por apoptose e necrose, respectivamente. Nos gráficos **D** e **E** vê-se os resultados do efeito do LBI na morte celular por apoptose (Anexina V-FITC) e necrose (PI-PE), respectivamente do veneno de *B. jararaca*. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Teste estatístico: One-Way Anova com pós teste de Tukey; \* p < 0,05 em relação ao controle e # p < 0,05 em relação ao veneno.

## 2.2. Efeito do veneno de *B. jararacussu* na morte celular

Assim como para o veneno de *B. jararaca*, também foi realizada a citometria de fluxo com células da linhagem de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com o veneno de *B. jararacussu*, na concentração de 50 µg/mL, por 2 horas; como pode ser observado na **Figura 13**, que mostra os gráficos produzidos pelo citômetro, onde a **Figura 13A** representa o grupo controle, **13B** o grupo incubado apenas com veneno e **13C** o grupo com veneno e irradiado com LBI no mesmo momento. Os gates **P1**, **P2** e **P3**, demonstrados nas mesmas figuras, são a população de células avaliada, as células marcadas com Anexina V – FITC indicando apoptose e as células marcadas com PI – PE indicando necrose, respectivamente.

Observou-se então, que não houve diferença significativa na morte celular por apoptose pelo veneno de *B. jararacussu* em nenhum dos grupos avaliados, sendo que o grupo controle apresentou 4,4 % ± 1,3 de morte celular por apoptose, o grupo veneno 16,6 % ± 6,5 e o grupo veneno + LBI 10,4 % ± 4,4 (**Figura 13D**).

Já, para necrose (**Figura 13E**), houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo veneno (21,9 % ± 4,6) com o grupo controle (6,3 % ± 0,7), mostrando um aumento da morte celular no grupo veneno e, quando comparado o grupo veneno + LBI (9,2 % ± 2,4) com o grupo incubado apenas com o veneno de *B. jararacussu*, pode ser observada uma diminuição significativa da morte celular por necrose, equiparando-se ao grupo controle e mostrando a efetividade do LBI.



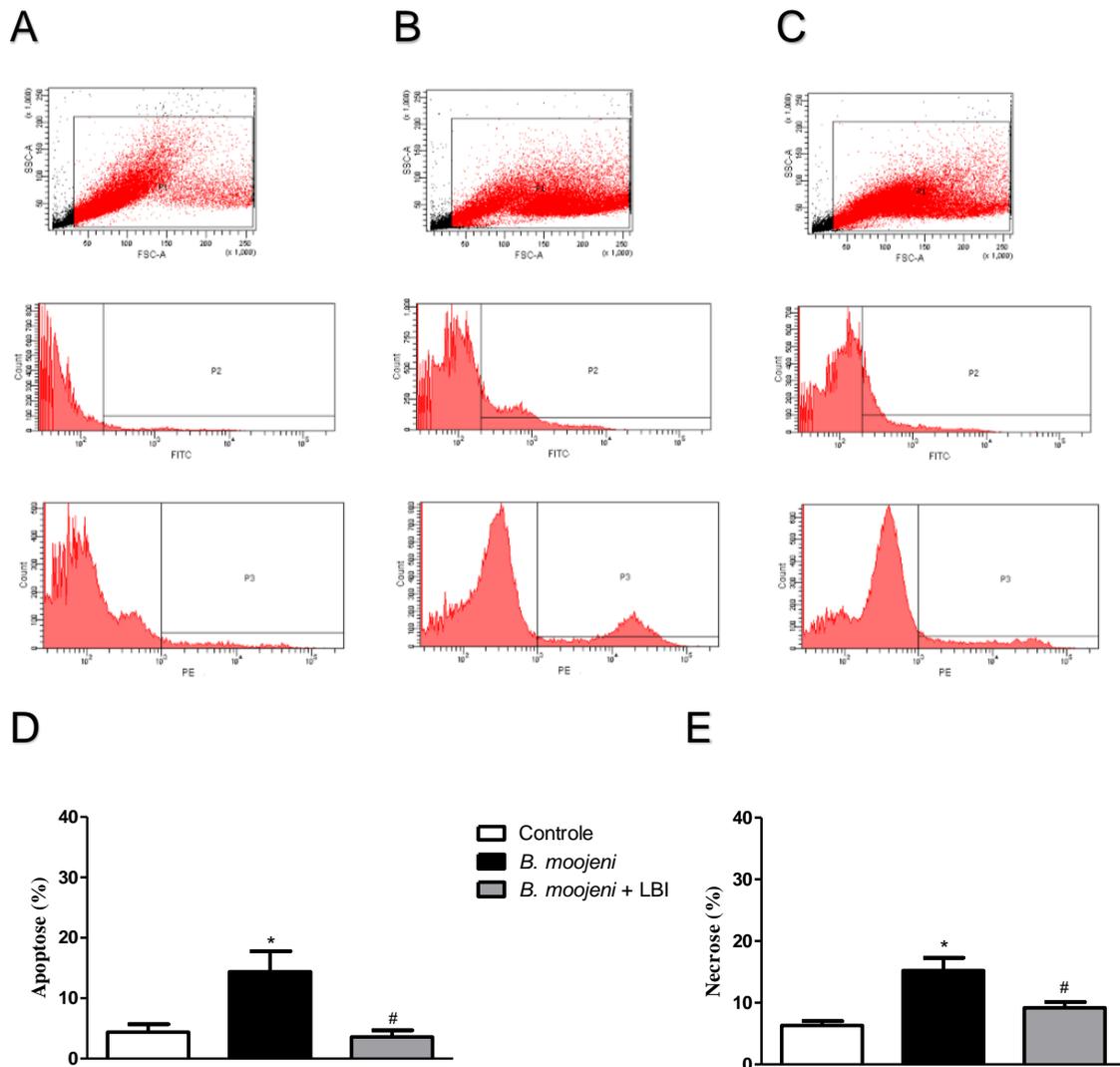
**Figura 13. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular o para o veneno de *Bothrops jararacussu*.** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas em placas de 6 poços por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno (50 µg/mL) ao grupo veneno e no grupo veneno + LBI além do veneno as células foram imediatamente irradiadas com LBI; ambos os grupos foram incubados por 2 horas e, em seguida, realizada a citometria de fluxo. Como grupo controle foram utilizadas células incubadas apenas com meio de cultura DMEM. **(A)** Citometria do grupo CONTROLE. **(B)** Citometria do grupo VENENO. **(C)** Citometria do grupo VENENO + LBI. Nos primeiros gráficos **(A, B e C)** está o gate da população de células analisada **(P1)**. Em seguida, a fluorescência de Anexina V – FITC **(P2)** e de PI – PE **(P3)**, representando as mortes celulares por apoptose e necrose, respectivamente. Nos gráficos **D e E** vê-se os resultados do efeito do LBI na morte celular por apoptose (Anexina V-FITC) e necrose (PI-PE), respectivamente do veneno de *B. jararacussu*. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Teste estatístico: One-Way Anova com pós teste de Tukey; \* p < 0,05 em relação ao controle e # p < 0,05 em relação ao veneno.

### 2.3. Efeito do veneno de *B. moojeni* na morte celular

Para avaliar a morte celular com o veneno de *B. moojeni* as células da linhagem de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas com o veneno na concentração de 50 µg/mL por 2 horas e, em seguida, foi realizada a citometria de fluxo, como pode ser observado na **Figura 14**. Da mesma forma como os outros venenos, os resultados gráficos da citometria são demonstrados na **Figura 14A, B e C**, onde **A** representa o grupo controle, **B** o grupo incubado apenas com veneno e **C** o grupo com veneno e irradiado com LBI no mesmo momento. Os gates **P1**, **P2** e **P3**, demonstrados nas mesmas figuras, são a população de células avaliada, as células marcadas com Anexina V – FITC indicando apoptose e as células marcadas com PI – PE indicando necrose, respectivamente.

Os resultados encontrados para o veneno de *B. moojeni* foram semelhantes aos resultados do veneno da *B. jararaca* e demonstraram aumento significativo na porcentagem de morte celular por apoptose no grupo veneno (14,4 % ± 3,4) quando comparado ao grupo controle (4,4 % ± 1,3), como demonstrado na **Figura 14D**. De forma semelhante, quando foi avaliada a morte celular por necrose houve também um aumento significativo do grupo veneno (15,2 % ± 2,1) em relação ao controle (6,3 % ± 0,7), **Figura 14E**.

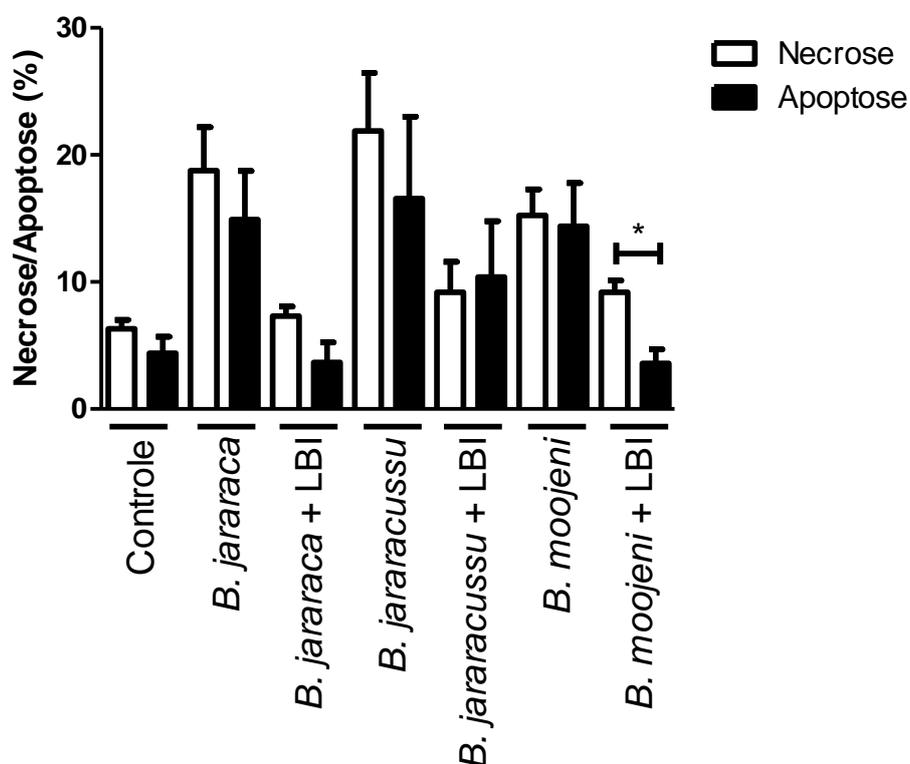
A aplicação do LBI também mostrou-se efetiva já que reduziu significativamente a morte celular causada tanto por apoptose (3,6 % ± 1,1) quanto por necrose (9,2 % ± 0,9) para o veneno de *B. moojeni* (**Figura 14D e E**, respectivamente) comparando com o grupo veneno, e não apresentou diferença significativa do grupo controle.



**Figura 14. Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na avaliação da morte celular para o veneno de *Bothrops moojeni*.** Células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram incubadas em placas de 6 poços por 24 horas para adesão celular. Após esse período foi adicionado o veneno (50 µg/mL) ao grupo veneno e no grupo veneno + LBI além do veneno as células foram imediatamente irradiadas com LBI; ambos os grupos foram incubados por 2 horas e, em seguida, realizada a citometria de fluxo. Como grupo controle foram utilizadas células incubadas apenas com meio de cultura DMEM. **(A)** Citometria do grupo CONTROLE. **(B)** Citometria do grupo VENENO. **(C)** Citometria do grupo VENENO + LBI. Nos primeiros gráficos **(A, B e C)** está o gate da população de células analisada **(P1)**. Em seguida, a fluorescência de Anexina V – FITC **(P2)** e de PI – PE **(P3)**, representando as mortes celulares por apoptose e necrose, respectivamente. Nos gráficos **D e E** vê-se os resultados do efeito do LBI na morte celular por apoptose (Anexina V-FITC) e necrose (PI-PE), respectivamente do veneno de *B. moojeni*. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em duplicata. Teste estatístico: One-Way Anova com pós teste de Tukey; \* p < 0,05 em relação ao controle e # p < 0,05 em relação ao veneno.

## 2.4. Comparação entre necrose e apoptose

Quando as mortes celulares, por necrose e apoptose, foram comparadas entre o mesmo veneno, não se observou diferença significativa para a maioria deles. Apenas para o veneno de *B. moojeni* é que houve mais morte celular por necrose do que por apoptose após aplicação do LBI (**Figura 15**).

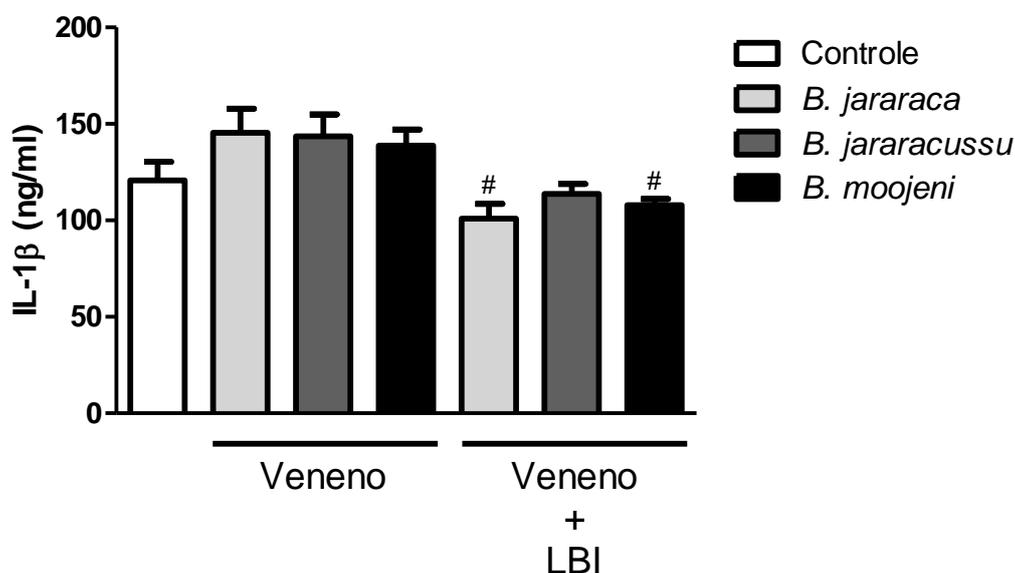


**Figura 15. Comparação entre necrose e apoptose avaliadas por citometria de fluxo.** Foram comparados os processos de morte celular por necrose e apoptose entre o mesmo veneno estudado. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM com teste estatístico One-Way Anova e pós teste de Tukey; \*  $p < 0,05$ .

### 3. Liberação de citocinas celulares

#### 3.1. Interleucina IL-1 $\beta$

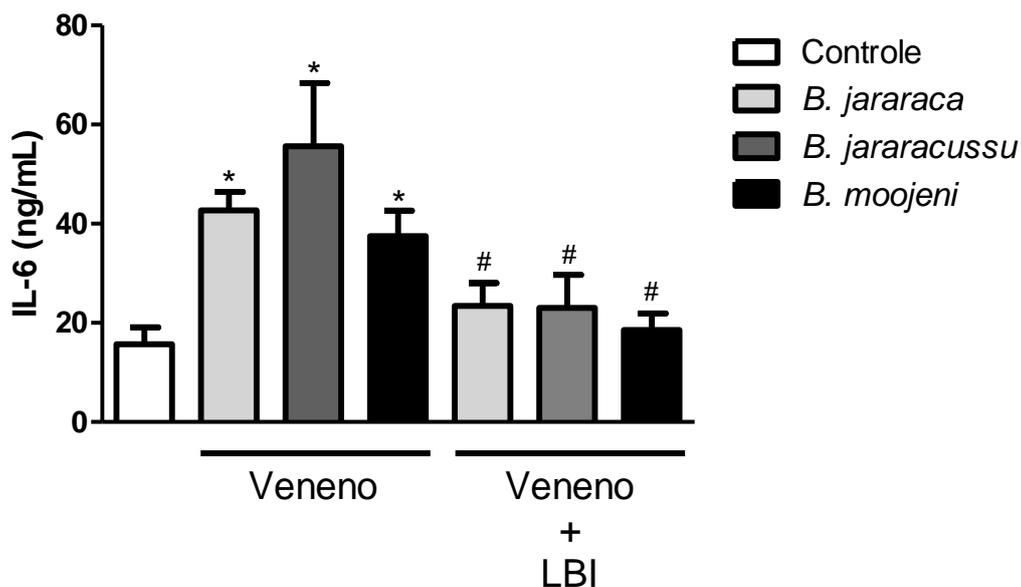
A interleucina IL-1  $\beta$  foi mensurada através da técnica de ELISA e está demonstrada na **Figura 16**. Os resultados demonstraram significância nos grupos de *B. jararaca* (100,8 ng/mL  $\pm$  7,7) e *B. moojeni* (107,9 ng/mL  $\pm$  3,2) que foram irradiados com LBI e mostraram uma diminuição na liberação de IL-1  $\beta$  quando comparados com seus respectivos grupos de veneno sem irradiação do LBI (*B. jararaca*: 145,4 ng/mL  $\pm$  12,5 e *B. moojeni*: 138,7 ng/mL  $\pm$  8,4). Apesar de não ocorrer significância estatística no resultado do veneno de *B. jararacussu* o LBI parece diminuir a liberação dessa citocina.



**Figura 16. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-1  $\beta$ .** Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-1  $\beta$  por células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (50  $\mu$ g/mL) comparando com o grupo controle incubado apenas com meio DMEM e com o grupo veneno mais laser onde as células foram imediatamente irradiadas com LBI no momento da aplicação do veneno; os grupos foram incubados por 2 horas e posteriormente foi realizado o ensaio de ELISA. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM da concentração da IL-1  $\beta$  nas amostras, sendo o teste Anova com Tukey utilizado para os testes estatísticos; com significância igual à # p < 0,05 em relação ao grupo veneno.

### 3.2. Interleucina IL-6

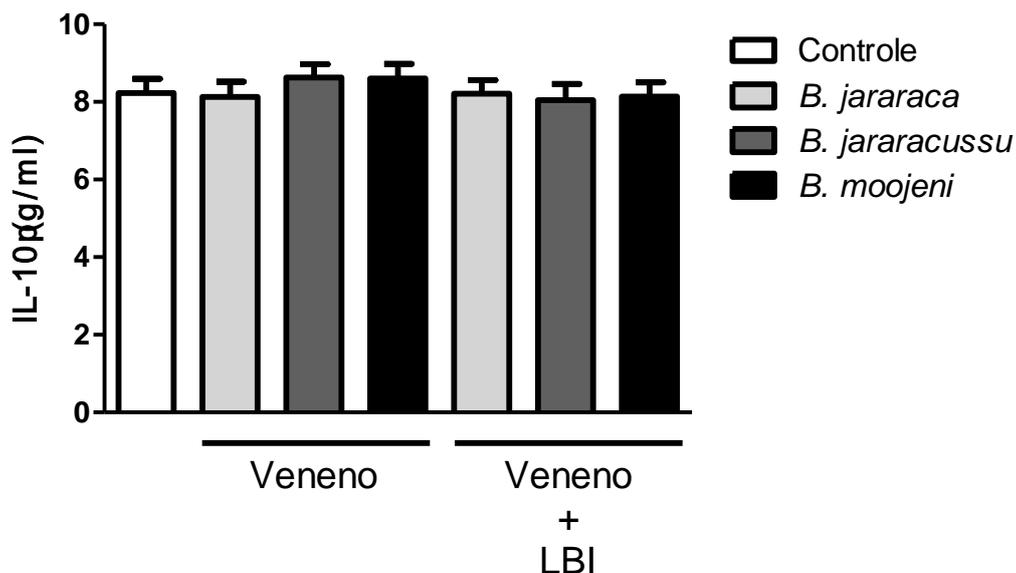
Para avaliação da interleucina IL-6 também foi utilizado o ensaio de ELISA e como resultado houve o aumento na liberação de IL-6 pelos grupos que sofreram a ação dos respectivos venenos quando comparados ao grupo controle, mostrando a ação do veneno no processo inflamatório; e com a aplicação do LBI houve uma diminuição na liberação dessa citocina em todos os grupos, mostrando efetiva ação do LBI revertendo essa liberação e tendo valores semelhantes ao grupo controle. Para os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* os valores de IL-6 foram de  $42,7 \pm 3,7$  ng/mL,  $55,7 \pm 12,7$  ng/mL e  $37,5 \pm 5,2$  ng/mL, respectivamente. Enquanto para o grupo controle que não sofreu a ação do veneno o resultado foi de  $15,7 \pm 3,4$  ng/mL. Para os grupos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* irradiados com LBI os valores de IL-6 foram de  $23,4 \pm 4,6$  ng/mL,  $23,0 \pm 6,7$  ng/mL e  $18,59 \pm 3,3$  ng/mL, respectivamente (**Figura 17**).



**Figura 17. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-6.** Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-6 por células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (50 µg/mL) comparando com o grupo controle incubado apenas com meio DMEM e com o grupo veneno mais laser onde as células foram imediatamente irradiadas com LBI no momento da aplicação do veneno; os grupos foram incubados por 2 horas e posteriormente foi realizado o ensaio de ELISA. Cada valor representa a média ± SEM da concentração da IL-6 nas amostras, sendo o teste Anova com Tukey utilizado para os testes estatísticos; com significância igual à \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo veneno.

### 3.3. Interleucina IL-10

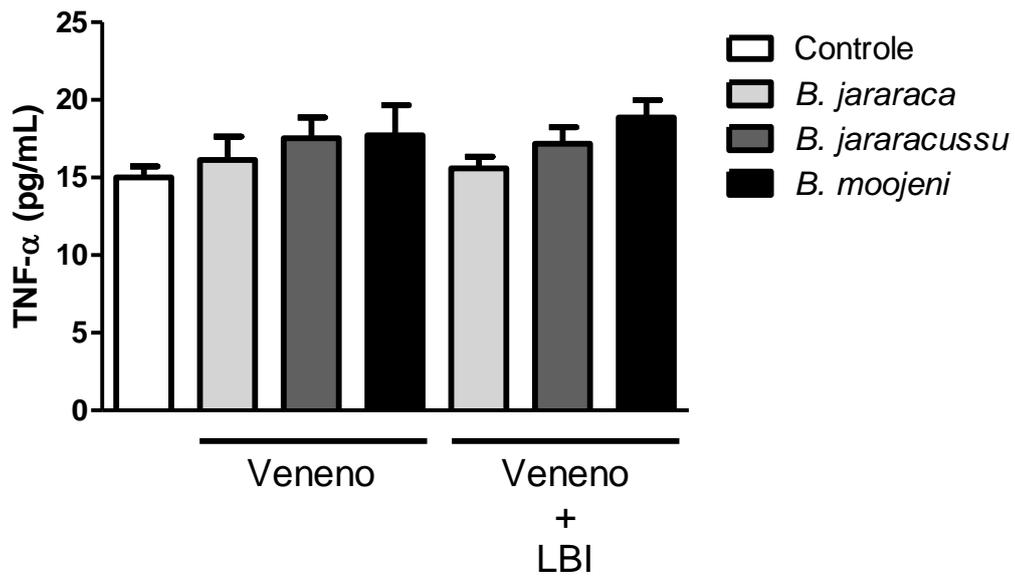
Os resultados da liberação de interleucina IL-10 pelas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> não foram significantes em nenhum dos grupos estudados demonstrando que o veneno das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* não estimulou a liberação dessa citocina por células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> no período de 2 horas de incubação. O LBI também não mostrou ação na produção de IL-10 (**Figura 18**), mantendo sempre valores próximos e semelhantes aos do grupo controle que não sofreu ação do veneno.



**Figura 18. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de IL-10.** Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação da interleucina IL-10 por células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (50 µg/mL) comparando com o grupo controle incubado apenas com meio DMEM e com o grupo veneno mais laser onde as células foram imediatamente irradiadas com LBI no momento da aplicação do veneno; os grupos foram incubados por 2 horas e posteriormente foi realizado o ensaio de ELISA. Cada valor representa a média ± SEM da concentração da IL-6 nas amostras, sendo o teste Anova com Tukey utilizado para os testes estatísticos; com significância igual à  $p < 0,05$ .

### 3.4. Fator de necrose tumoral $\alpha$

O Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é um importante mediador do processo inflamatório. Porém, em nosso estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os grupos estudados e, então, os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*) não se mostraram efetivos na produção desse mediador durante as 2 horas de incubação do veneno com células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>; assim como o LBI não teve ação nesse processo, já que todos os grupos apresentaram-se semelhantes ao grupo controle, sem nenhuma intervenção (**Figura 19**).



**Figura 19. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a liberação de Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).** Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) na liberação de TNF- $\alpha$  por células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (50  $\mu$ g/mL) comparando com o grupo controle incubado apenas com meio DMEM e com o grupo veneno mais laser onde as células foram imediatamente irradiadas com LBI no momento da aplicação do veneno; os grupos foram incubados por 2 horas e posteriormente foi realizado o ensaio de ELISA. Cada valor representa a média  $\pm$  SEM da concentração de TNF- $\alpha$  nas amostras, sendo o teste Anova com Tukey utilizado para os testes estatísticos; com significância igual à  $p < 0,05$ .

#### **4. Resultados completos**

Em síntese, nossos resultados e suas respectivas interpretações podem ser representados na tabela a seguir (**Tabela 1**):

**TABELA 1. Quadro resumo.** De acordo com a média e o erro padrão da média (SEM) de todos os experimentos realizados comparando os grupos: Controle, incubado apenas com meio DMEM; Veneno, incubado com os respectivos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (50 µg/mL); e Veneno + LBI, incubado com os respectivos venenos e imediatamente irradiado com o Laser de Baixa Intensidade (LBI), os resultados foram avaliados e segue sua interpretação, considerando significativa  $p < 0,05$ . Todos os grupos foram incubados por 2 horas para avaliação da ação do LBI em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Ensaio	VENENO x CONTROLE			VENENO + LBI x VENENO		
	<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. moojeni</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. moojeni</i>
<b>Viabilidade Celular</b> (células/campo)	↓	↓	↓	↑	↑	↑
<b>Apoptose</b> (%)	↑	-	↑	↓	-	↓
<b>Necrose</b> (%)	↑	↑	↑	↓	↓	↓
<b>IL-1 β</b> (ng/mL)	-	-	-	↓	-	↓
<b>IL-6</b> (ng/mL)	↑	↑	↑	↓	↓	↓
<b>IL-10</b> (ng/mL)	-	-	-	-	-	-
<b>TNF-α</b> (pg/mL)	-	-	-	-	-	-

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

*Discussão*

---

O envenenamento por picada de serpente é considerado uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com importância clínica e social em todo o mundo<sup>(1, 3)</sup>. Assim, este trabalho tem por objetivo buscar a elucidação de mecanismos celulares que possam ajudar no tratamento a esse agravo, compreendendo melhor o mecanismo de morte celular, tanto por necrose quanto por apoptose, a liberação de citocinas pelas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> frente a ação do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e avaliando a ação do Laser de Baixa Intensidade (LBI) nesse processo.

As serpentes do gênero *Bothrops* são as que causam um maior número de acidentes no Brasil, sendo responsáveis por aproximadamente 73% dos casos de ofidismo notificados em todo o território nacional<sup>(12)</sup>. Neste estudo, foi então, analisada a ação dos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

No presente estudo os mioblastos de linhagem C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram usados para avaliar o efeito direto do veneno das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre a célula muscular já que o uso de mioblastos/miotubos de músculo esquelético como alvo para veneno ou toxinas tem sido sugerido como um modelo viável *in vitro* para estudar os mecanismos miotóxicos, uma vez que se correlaciona com a miotoxicidade *in vivo*<sup>(71)</sup>.

Assim, neste estudo foi primeiramente verificada a ação miotóxica dos venenos estudados sobre as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e os resultados mostraram diminuição significativa no número de células para os grupos incubados com os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, mostrando que ocorreu significativa morte celular. Já, para os grupos que foram irradiados com o LBI observou-se um número maior de células, demonstrando menor morte celular após o tratamento com LBI. Silva *et al.*, também observaram aumento da viabilidade celular após tratamento com LBI em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> que sofreram ação do veneno de *B. jararacussu*<sup>(59)</sup>, corroborando assim, nossos resultados.

Segundo Silva *et al.* (2016)<sup>(59)</sup>, a viabilidade celular varia de acordo com a dose do veneno administrada e, em estudo com células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e veneno de *B. jararacussu*, as células começaram a perder a viabilidade na

concentração de 12,5 µg/mL mesmo com pouco tempo de exposição (15 minutos), enquanto para uma dose menor de 6 µg/mL foram necessários 30 minutos para diminuição da viabilidade. Da mesma forma, em células musculares, Santos *et al.* (2018)<sup>(61)</sup>, mostraram que uma das miotoxinas presentes no veneno de *B. jararacussu*, a Bothropstoxin-I (BthTX-I), da classe das fosfolipases A2 (PLA2), diminuiu a viabilidade celular de acordo com a dose administrada (25, 50 and 75 µg/mL), mas com a aplicação do LBI a perda da viabilidade é atenuada principalmente pela redução do dano a membrana plasmática. Outro estudo, com células endoteliais, mostrou que a viabilidade celular diminuiu após 1 hora de exposição ao veneno de *B. jararaca* mesmo em concentrações baixas e com a aplicação do LBI, utilizando comprimentos de onda diferentes (660 e 780nm), ocorre aumento da viabilidade celular<sup>(66)</sup>. Ainda, Silva *et al.*, demonstraram que o LBI protege as células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> contra o efeito do veneno de *B. jararacussu* e essa proteção está relacionada ao aumento de fatores miogênicos MyoD e miogenina<sup>(59)</sup>.

Além disso, para o veneno de *B. jararaca*, em nosso estudo, foi observada diferença significativa na viabilidade celular entre o grupo controle e o grupo veneno irradiado com LBI, tendo um aumento do número de células no grupo tratado e indicando assim, não apenas ausência de morte celular, mas também proliferação celular induzida pela aplicação do LBI. Da mesma forma, outros estudos também mostraram aumento de proliferação celular após irradiação com o LBI<sup>(72, 73)</sup>.

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por apresentar intensa reação inflamatória no local da picada já que apresenta ação proteolítica, anticoagulante e hemorrágica<sup>(12, 24, 25)</sup>, com intensa mionecrose no membro afetado<sup>(20, 22)</sup>. Pode também ocasionar morte celular por necrose ou apoptose<sup>(40-42)</sup>.

Morte celular é o processo onde ocorre uma degeneração celular irreversível que irá culminar na perda da integridade celular<sup>(74)</sup>, podendo ser desencadeada por estímulos internos ou externos. Ela pode se apresentar como apoptose, que é considerada uma morte celular programada, onde diversos processos biológicos são ativados para a destruição celular sem que seja

desencadeada uma resposta inflamatória; ou por necrose, que é uma morte celular ocasionada por um estímulo mais intenso com total ruptura da membrana celular, extravasamento do material intracelular e consequente intensa reação inflamatória<sup>(44, 46)</sup>.

Todos os venenos aqui estudados causaram aumento de morte celular por necrose e os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* também causaram aumento de morte celular por apoptose. Em cultura de células tumorais, já foi observado que uma das miotoxinas do veneno de *B. jararacussu*, a BthTX-I, é capaz de diminuir a viabilidade celular e causar a morte celular tanto por apoptose quanto por necrose, dependendo da concentração da miotoxina utilizada<sup>(40)</sup>. Outro estudo também com células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> utilizando baltergin, uma metaloproteinase do veneno de *B. alternatus*, demonstrou que após a exposição a toxina do veneno (200 µg/mL) por 4 horas as células apresentavam condições morfológicas características de morte celular por apoptose, com integridade da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos<sup>(42)</sup>.

Quando os venenos foram irradiados com o LBI, houve uma diminuição da apoptose para os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* e de necrose para todos os venenos estudados. Assim, podemos notar uma efetividade do tratamento com LBI em relação a diminuição da morte celular decorrente do veneno. Já foi demonstrado também que o veneno de *B. jararaca* induz a perda da integridade de células endoteliais, com consequente morte celular, e a fotobiomodulação do LBI causa proteção celular e diminuição dessa morte<sup>(67)</sup>. Ainda, o LBI protege células endoteliais contra apoptose induzida por TNF-α através da inibição das vias de sinalização p38 e MAPK<sup>(75)</sup>.

Nas células que foram incubadas com o veneno de *B. moojeni*, que é um veneno que apresenta alta atividade proteolítica por seu alto nível de PLA<sub>2</sub><sup>(25)</sup>, foi observado que houve uma diferença significativa entre necrose e apoptose quando estas foram imediatamente irradiadas com o LBI, apresentando maior morte celular por necrose. Apesar dessa diferença, entre apoptose e necrose, no geral, a irradiação com LBI foi capaz de diminuir ambos os tipos de morte

celular, mostrando que o LBI não apresenta maior efetividade na diminuição de apenas uma das mortes celulares, mas sim de ambas.

Outra principal complicação do envenenamento por *Bothrops* é a insuficiência renal aguda<sup>(15, 20)</sup> e, então, um estudo com cultura de células renais que foram incubadas com 1,56 à 100 µg/mL de L-amino acid oxidase (LAAO), uma proteína presente em diversos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, causadora de citotoxicidade, mostrou que após 12 horas de incubação as células apresentaram redução da viabilidade nas diversas concentrações do veneno. Interessante, é que foram utilizadas duas linhagens de células diferentes para análise do tipo de morte celular que estaria relacionado com a diminuição da viabilidade, uma humana e outra animal; sendo que na linhagem humana (HK-2) houve maior marcação de células necróticas enquanto a linhagem animal (MDCK) apresentou mais células em apoptose, indicando que mecanismos diferentes estão relacionados ao tipo de morte celular e, o estresse oxidativo das células renais, poderia levar ao aumento de morte celular por apoptose<sup>(43)</sup>.

Em nosso trabalho, observou-se que para todos os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* estudadas a morte celular por necrose parece ser maior do que a morte por apoptose e, embora esses resultados não tenham sido significantes, podem mostrar uma tendência necrótica do veneno, com destruição tecidual e intensa reação inflamatória, já que muitos outros estudos apontam o veneno de *Bothrops* como causador de intensa mionecrose tecidual<sup>(26, 27, 28, 29)</sup>. É possível também que o tempo avaliado em nosso estudo não tenha sido adequado para verificar essa diferença.

Já, com relação as citocinas produzidas em resposta ao processo inflamatório ocasionado pelo veneno, verificou-se que houve aumento de IL-6 no grupo incubado apenas com os venenos estudados (*B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*) e diminuição significativa nos grupos onde além do veneno foi aplicado o LBI. Já foi demonstrado que em modelo animal ocorre um aumento de IL-6 após exposição ao veneno de *B. moojeni* e com o tratamento por LBI ocorre diminuição desse mediador inflamatório<sup>(50)</sup>. Ademais, o veneno de *B. jararaca* também é capaz de aumentar os níveis de IL-6 em modelo animal, podendo desta forma induzir o processo de necrose tecidual ocasionado pelo

veneno e aumentar o processo inflamatório no local da picada<sup>(36, 55)</sup>. A IL-6, começa a aparecer entre 1 à 4 horas de exposição ao veneno de *B. jararaca*, estando também relacionada ao processo agudo da inflamação, mas com uma permanência maior já que apenas após 6 horas de exposição é que Zamuner *et al.* observaram que os níveis de IL-6 voltavam ao normal em modelo animal<sup>(39)</sup>, corroborando assim nossos resultados.

Em nosso estudo não foi observada a liberação de IL-1  $\beta$  nas células incubadas com os venenos avaliados. Entretanto, em nosso modelo, houve diminuição dessa citocina após a aplicação do LBI, para os grupos que sofreram ação dos venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni*, sendo esse um dado curioso, uma vez que não houve diferença entre os grupos controle e veneno. Outro estudo mostra que essa citocina pró-inflamatória aumenta em modelo animal após 4 horas de exposição ao veneno de *B. moojeni*<sup>(76)</sup>. Ainda, a IL-1  $\beta$  aparece aumentada também em células endoteliais incubadas com veneno de *B. jararaca* e o tratamento com LBI causa redução significativa de seus níveis, mostrando mais uma vez a ação do laser na diminuição do processo inflamatório<sup>(67)</sup>.

Também não foram encontradas diferenças significantes na produção do mediador TNF- $\alpha$  em células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Corroborando nossos resultados, um estudo em modelo animal com veneno de *B. atrox* (0,5  $\mu$ g/mL) avaliou a presença de TNF- $\alpha$  após 1, 4 e 8 horas de exposição ao veneno e mostrou que após 1 hora de exposição houve aumento de TNF- $\alpha$ , mas após esse tempo o TNF- $\alpha$  não foi mais detectado, podendo estar mais relacionado com a resposta inicial ao processo inflamatório e recrutamento de leucócitos para o local da picada<sup>(53)</sup>.

A citocina IL-10 está relacionada com a resolução do processo inflamatório e começa a se elevar após 8 horas do início desse processo<sup>(52, 65)</sup>. Assim, em nosso modelo experimental, com 2 horas de incubação das células com o veneno, não houve diferença significativa desse mediador em nenhum dos grupos estudados, provavelmente em decorrência do tempo avaliado. Já, em estudo com modelo animal que sofreu a ação do veneno de *B. moojeni*, foi verificada a diminuição desse mediador anti-inflamatório. Esses autores

observaram também aumento desse mediador com a aplicação do LBI, propiciando assim uma redução da resposta inflamatória local<sup>(50)</sup>.

Embora um dos principais tratamentos atuais para o envenenamento por picada de serpente seja a soroterapia com soro antiofídico<sup>(29)</sup>, animais tratados apenas com o soro não apresentaram diminuição significativa de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , indicando o LBI como um complemento importante ao tratamento com soro antiofídico para melhora da reação inflamatória local ao veneno<sup>(50)</sup>.

*Conclusão*

---

- Todos os venenos estudados causaram diminuição da viabilidade de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

- O LBI aumenta a viabilidade de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubadas com os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

- Além do aumento da viabilidade o LBI causa proliferação celular em células incubadas com o veneno de *B. jararaca*.

- Os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, causaram aumento de morte celular por necrose e os venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni* também aumentaram a morte celular por apoptose.

- A irradiação com o LBI diminuiu a morte celular por necrose em todos os venenos estudados e por apoptose nos venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni*, mas não houve diferença quanto ao tipo de morte celular nas células musculares C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> para os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*. Apenas quando aplicado o LBI nas células que receberam o veneno de *B. moojeni* é que houve maior porcentagem de morte por necrose.

- Os venenos estudados causaram aumento da citocina IL-6. Não houve aumento de IL-1  $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  pelos venenos estudados.

- Verificamos redução de IL-6 com a aplicação do LBI. Para IL-1  $\beta$  a aplicação do LBI foi efetiva apenas nos venenos de *B. jararaca* e *B. moojeni*.

- Não houve ação do LBI para IL-10 e TNF- $\alpha$  no modelo estudado.

## *Referências Bibliográficas*

---

1. Bagcchi S. Experts call for snakebite to be re-established as a neglected tropical disease. *BMJ*. 2015;351:h5313.
2. Chippaux JP. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017;23:38.
3. Organization WH. Neglected tropical diseases 2017 [Available from: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)].
4. Organization WH. Neglected zoonotic diseases [Available from: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/zoonoses/infections\\_more/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en/)].
5. Organization WH. Snakebite envenoming 2017 [Available from: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>].
6. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 2008;5(11):e218.
7. Organization WH. Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010.
8. Saúde Md. PORTARIA Nº 2.472, DE 31 DE AGOSTO DE 2010 2010 [Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/172-noticias-anteriores-vigilancia/8094-saude-amplia-lista-de-doencas-de-notificacao-compulsoria>].
9. Saúde Md. PORTARIA NO - 204, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2016 2016 [Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204\\_17\\_02\\_2016.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html)].
10. Saúde Md. Situação Epidemiológica - Dados 2017 [Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>].
11. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005662.
12. Saúde FNd. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Segunda ed. Brasília2001.
13. Bochner R, Struchiner CJ. [Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review]. *Cad Saude Publica*. 2003;19(1):7-16.
14. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17079.
15. Gois PHF, Martines MS, Ferreira D, Volpini R, Canale D, Malaque C, et al. Allopurinol attenuates acute kidney injury following Bothrops jararaca envenomation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):e0006024.
16. Amorim FG, Morandi-Filho R, Fujimura PT, Ueira-Vieira C, Sampaio SV. New findings from the first transcriptome of the Bothrops moojeni snake venom gland. *Toxicon*. 2017;140:105-17.
17. Chan YS, Cheung RC, Xia L, Wong JH, Ng TB, Chan WY. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6165-81.
18. Junqueira-de-Azevedo IL, Campos PF, Ching AT, Mackessy SP. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. *Toxins (Basel)*. 2016;8(8).
19. Sunagar K, Morgenstern D, Reitzel AM, Moran Y. Ecological venomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. *J Proteomics*. 2016;135:62-72.

20. Ministério da Saúde SdAàS, Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde : zoonoses. 2009.
21. Mamede CC, de Sousa BB, Pereira DF, Matias MS, de Queiroz MR, de Moraes NC, et al. Comparative analysis of local effects caused by Bothrops alternatus and Bothrops moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*. 2016;117:37-45.
22. Farias IB, Moraes-Zani K, Serino-Silva C, Sant'Anna SS, Rocha MMTD, Grego KF, et al. Functional and proteomic comparison of Bothrops jararaca venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. *J Proteomics*. 2018;174:36-46.
23. Tasoulis T, Isbister GK. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*. 2017;9(9).
24. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(6):739-58.
25. Campos LB, Pucca MB, Roncolato EC, Bertolini TB, Netto JC, Barbosa JE. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. venoms. *Toxicon*. 2013;76:1-10.
26. Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of Bothrops asper. *Exp Mol Pathol*. 1984;40(3):367-79.
27. Brenes F, Gutiérrez JM, Lomonte B. Immunohistochemical demonstration of the binding of Bothrops asper myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. *Toxicon*. 1987;25(5):574-7.
28. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon*. 1995;33(11):1405-24.
29. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado MeF, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon*. 2008;52(8):842-51.
30. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1824(1):164-76.
31. Silva MC, Lopes Silva T, Silva MV, Mota CM, Santiago FM, Fonseca KC, et al. Interaction between TNF and BmooMP-Alpha-I, a Zinc Metalloprotease Derived from Bothrops moojeni Snake Venom, Promotes Direct Proteolysis of This Cytokine: Molecular Modeling and Docking at a Glance. *Toxins (Basel)*. 2016;8(7).
32. Paes Leme AF, Sherman NE, Smalley DM, Sizukusa LO, Oliveira AK, Menezes MC, et al. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. *J Proteome Res*. 2012;11(1):279-91.
33. Markland FS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2013;62:3-18.
34. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi MV, et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2014;2014:203639.
35. Oyama E, Takahashi H. Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan. *Molecules*. 2017;22(8).

36. Laing GD, Clissa PB, Theakston RD, Moura-da-Silva AM, Taylor MJ. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur J Immunol*. 2003;33(12):3458-63.
37. Lopes DS, Faquim-Mauro E, Magalhães GS, Lima IC, Baldo C, Fox JW, et al. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. *Toxicon*. 2012;60(6):1072-84.
38. Cidade DA, Simão TA, Dávila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, et al. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*. 2006;48(4):437-61.
39. Zamunér SR, da Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*. 2004;44(3):259-71.
40. Prinholato da Silva C, Costa TR, Paiva RM, Cintra AC, Menaldo DL, Antunes LM, et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from Bothrops jararacussu snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2015;21:44.
41. Machado ART, Aissa AF, Ribeiro DL, Hernandez LC, Machado CS, Bianchi MLP, et al. The toxin BjussuLAAO-II induces oxidative stress and DNA damage, upregulates the inflammatory cytokine genes TNF and IL6, and downregulates the apoptotic-related genes BAX, BCL2 and RELA in human Caco-2 cells. *Int J Biol Macromol*. 2018;109:212-9.
42. Bustillo S, Van de Velde AC, Matzner Perfumo V, Gay CC, Leiva LC. Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from Bothrops alternatus venom in C2C12 muscle cells. *Apoptosis*. 2017;22(4):491-501.
43. Morais IC, Pereira GJ, Orzáez M, Jorge RJ, Bincoletto C, Toyama MH, et al. L-Aminoacid Oxidase from Bothrops leucurus Venom Induces Nephrotoxicity via Apoptosis and Necrosis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132569.
44. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
45. Robbins SL, Cotran RS. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
46. Elkon KB. *Cell Death, Nucleic acids and Immunity: Inflammation beyond the Grave*. *Arthritis Rheumatol*. 2018.
47. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-89.
48. Bernardes-Oliveira E, Gomes DL, Martelli Palomino G, Juvenal Silva Farias K, da Silva WD, Rocha HA, et al. and. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;2016:1574971.
49. de Sousa FC, Jorge AR, de Menezes RR, Torres AF, Mello CP, Lima DB, et al. Bothrops erythromelas () venom induces apoptosis on renal tubular epithelial cells. *Toxicon*. 2016;118:82-5.
50. Nadur-Andrade N, Dale CS, Oliveira VR, Toniolo EF, Feliciano RD, da Silva JA, et al. Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(10):e0004998.
51. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

52. Bernardes CP, Menaldo DL, Mamede CC, Zoccal KF, Cintra AC, Faccioli LH, et al. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from Bothrops pirajai venom. *Mol Immunol.* 2015;68(2 Pt B):456-64.
53. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, Borges da Silva H, Fernandes CM, D'Império Lima MR, et al. Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon.* 2012;60(1):12-20.
54. Girish KS, Kemparaju K. Overlooked issues of snakebite management: time for strategic approach. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(20):2494-508.
55. Zamuner SR, Teixeira CF. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake Bothrops jararaca. *Mediators Inflamm.* 2002;11(6):351-7.
56. Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon.* 2002;40(5):501-9.
57. Santhosh MS, Sundaram MS, Sunitha K, Kemparaju K, Girish KS. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. *Inflamm Res.* 2013;62(7):721-31.
58. Dourado DM, Matias R, Barbosa-Ferreira M, da Silva BAK, de Araujo Isaias Muller J, Vieira WF, et al. Effects of photobiomodulation therapy on Bothrops moojeni snake-envenomed gastrocnemius of mice using enzymatic biomarkers. *Lasers Med Sci.* 2017;32(6):1357-66.
59. Silva LM, Silva CA, Silva A, Vieira RP, Mesquita-Ferrari RA, Cogo JC, et al. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152890.
60. Nadur-Andrade N, Barbosa AM, Carlos FP, Lima CJ, Cogo JC, Zamuner SR. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):65-70.
61. Santos ASD, Guimarães-Sousa L, Costa MS, Zamuner LF, Sousa NC, Hyslop S, et al. Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A. *Int J Biol Macromol.* 2018;107(Pt B):2020-5.
62. Nadur-Andrade N, Dale CS, Santos AS, Soares AM, de Lima CJ, Zamuner SR. Photobiostimulation reduces edema formation induced in mice by Lys-49 phospholipases A2 isolated from Bothrops moojeni venom. *Photochem Photobiol Sci.* 2014;13(11):1561-7.
63. Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):849-55.
64. Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(6):540-5.
65. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):161-6.
66. Nadur-Andrade N, Zamuner SR, Toniolo EF, de Lima CJ, Cogo JC, Dale CS. Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on Bothrops moojeni Venom-Induced Hyperalgesia. *Photochem Photobiol.* 2014;90(1):207-13.

67. Franco AT, Silva LM, Costa MS, Zamuner SF, Vieira RP, de Fatima Pereira Teixeira C, et al. Effect of photobiomodulation on endothelial cell exposed to Bothrops jararaca venom. *Lasers Med Sci.* 2016;31(5):1017-25.
68. Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC, et al. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4):591-7.
69. Barbosa A, Villaverde A, Guimarães-Sousa L, Soares A, Zamuner S, Cogo J. Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from Bothrops jararacussu snake venom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases [Internet].* 2010; (3):[470-9 pp.].
70. Dourado DM, Fávero S, Matias R, Carvalho PeT, da Cruz-Höfling MA. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. *Photochem Photobiol.* 2011;87(2):418-26.
71. Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon.* 1999;37(1):145-58.
72. Lipovsky A, Oron U, Gedanken A, Lubart R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.* 2013;28(4):1113-7.
73. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):291-7.
74. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
75. Chu YH, Chen SY, Hsieh YL, Teng YH, Cheng YJ. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- $\alpha$ /cycloheximide-induced apoptosis. *Lasers Med Sci.* 2018;33(2):279-86.
76. Stuqui B, de Paula-Silva M, Carlos CP, Ullah A, Arni RK, Gil CD, et al. Ac2-26 Mimetic Peptide of Annexin A1 Inhibits Local and Systemic Inflammatory Processes Induced by Bothrops moojeni Venom and the Lys-49 Phospholipase A2 in a Rat Model. *PLoS One.* 2015;10(7):e0130803.