

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

AMANDA CABRAL DAVID

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REAÇÃO LOCAL INDUZIDA PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus* EM SEUS ESTÁGIOS
JUVENIL E ADULTO**

São Paulo

2021

AMANDA CABRAL DAVID

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REAÇÃO LOCAL INDUZIDA PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus* EM SEUS ESTÁGIOS
JUVENIL E ADULTO**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Stella Regina Zamuner

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Juliana Pavan Zuliani

São Paulo

2021

David, Amanda Cabral.

Efeito da fotobiomodulação na reação local induzida pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus* em seus estágios juvenil e adulto. / Amanda Cabral David. 2021.

99 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª Juliana Pavan Zuliani

1. *Bothrops alternatus*. 2. Juvenil e adulto. 3. Fotobiomodulação. 4. Miotoxicidade. 5. Citotoxicidade.

I. Zamuner, Stella Regina. II. Zuliani, Juliana Pavan. III. Título

CDU 616



UNINOVE
Universidade Nove de Julho

São Paulo 16 de dezembro de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **AMANDA CABRAL DAVID**

Titulo da dissertação: **EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REAÇÃO LOCAL INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops alternatus* EM SEUS ESTÁGIOS JUVENIL E ADULTO.**

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ

Membro: PROFA. DRA. LAURA C. LEIVA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maisi e Marcio, que são o meu alicerce e sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e apoiando incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me manter firme mesmo diante de inúmeros obstáculos e por me guiar e iluminar meus passos até aqui.

Aos meus pais, Maisi Muniz Cabral David e Marcio Jucenei David, e ao meu irmão Arthur Cabral David, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Sem vocês eu não conseguiria. Obrigada por todo o amor, por toda a força e compreensão.

À minha querida orientadora, Prof^a Dra. Stella Regina Zamuner, pela inigualável orientação e ajuda no desenvolvimento desse estudo, pela amizade e carinho, pela confiança e paciência, e por todos os ensinamentos. Minha eterna gratidão e admiração.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Juliana Pavan Zuliani da FIOCRUZ de Rondônia, pela confiança, por me receber em seu laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde, pela amizade, carinho e todo o suporte durante a minha estadia em Rondônia.

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) pela oportunidade de realizar este mestrado e pela bolsa no Programa de Pós-Graduação em Medicina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, através da bolsa de estudo, que muito contribuiu para a execução desse trabalho. Processo: 2019/20890-7.

À Dra. Laura C. Leiva e Dra. María Emilia Garcia Denegri das Universidad Nacional del Nordeste Corrientes e Facultad de Ciencias Veterinarias – Argentina, pela doação dos venenos da serpente *Bothrops alternatus*.

Aos alunos da Pro^a. Dra. Juliana Pavan Zuliani: Alex A. Ferreira e Ferreira, Braz J. Farias, Carolina Silva, Charles Nunes Boeno, Cristina Matiele A. Rego, Hallison Mota Santana, Jéssica Amaral Lopes, Larissa, Mauro Valentino Paloschi, Milena Daniela S. Silva, Ortência de Oliveira Sousa, Ricardo S. da Silva Dutra, Sulamita Silva Setúbal, Suzanne Nery Serrath, Valdison

Pereira dos Reis e Yoda Janaina Ikenohuchi por dividirem comigo momentos felizes e agradáveis no laboratório e por toda ajuda e contribuição nesse estudo.

À Dra. Camila Squarzon Dale do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela confiança e permitir o livre acesso ao seu Laboratório de Neuromodulação da Dor, além do uso de seus equipamentos.

Aos colegas Aline da Silva, Cristiane L. Rocha Wagner, Flávia R. F. Soares Pisete, Hueliton Wilian Kido e Rodrigo B. Oliveira Brito, pela amizade e por compartilharem seus conhecimentos comigo e, de alguma forma, terem contribuído nesse estudo.

À Dra. Luciana Miato Gonçalves Silva, pela amizade, carinho e pela paciência, que mesmo de longe, não mediu esforços para me ajudar com os experimentos.

À doutoranda Victória R. da Silva Oliveira do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade e disponibilidade em sempre me ajudar.

Às alunas de Iniciação Científica, Ingrid Alves Lucena, Luiza Gabriela dos Santos, Maria Luiza de Oliveira Silva, Pietra Lopes Carminati, Rafaela de Melo Ferreira, Sarah Barboza Marins e Suan Micaela Alves Brito pelo companheirismo e por toda a ajuda que despenderam com os experimentos.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Medicina da UNINOVE, que de alguma maneira, contribuíram na minha formação.

Às técnicas dos laboratórios e biotério, secretárias e demais funcionários da UNINOVE, por todo o suporte e colaboração.

A todos que colaboraram, de alguma forma, direta ou indiretamente, na concretização deste trabalho e também no meu crescimento e aprimoramento profissional.

Meus sinceros agradecimentos!

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos na América Latina. O envenenamento botrópico provoca tanto efeitos sistêmicos, como efeitos locais graves. Além disso, é descrito que venenos de serpentes jovens e adultas possuem diferenças em sua composição, o que pode levar a diferenças na evolução do quadro local. O antiveneno botrópico é o tratamento de primeira escolha, entretanto, sua eficácia é limitada, sendo capaz de neutralizar somente os efeitos sistêmicos. Já foi demonstrado em estudos anteriores, que a fotobiomodulação (FBM) é promissora na redução dos efeitos locais induzidos por serpentes botrópicas. O objetivo deste estudo foi ampliar o conhecimento das ações do laser de baixa intensidade (LBI) sobre o efeito local, após ação do veneno da serpente *Bothrops alternatus* (VBa), em seus estágios juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA). Para isto, foram realizados experimentos *in vivo* com camundongos Balb-C e, *in vitro*, com células musculares C2C12. Para o tratamento, foi utilizado o LBI, 660 nm, 100 mW e 40 segundos de irradiação. *In vivo*, os animais foram injetados com o VBaJ ou VBaA, ou somente com salina e os grupos que receberam a FBM, o tratamento foi feito após 30 minutos da injeção dos venenos. Após 6 horas, foram analisados o edema, infiltrado inflamatório, a miotoxicidade e a histologia do músculo gastrocnêmio e, após 1, 3, 6 e 24 horas, foi analisada a hiperalgesia. *In vitro*, as células C2C12 receberam o VBaJ ou VBaA, ou somente meio de cultura, e foram imediatamente irradiadas com o LBI. Após 3 horas da ação dos venenos, foram avaliados a viabilidade celular, a citotoxicidade, a diferenciação, o potencial de membrana, a proliferação e a apoptose/necrose celular. Foi observado que, *in vivo*, o VBaJ e VBaA, nas doses aplicadas, foram capazes de induzir edema, infiltrado inflamatório, hemorragia, de aumentar a hiperalgesia e de causar miotoxicidade e mionecrose, em diferentes intensidades. *In vitro*, os dois venenos também causaram citotoxicidade, diminuíram a diferenciação celular, aumentaram a proliferação celular e também induziram apoptose. O tratamento com a FBM, *in vivo*, foi eficaz em reduzir a miotoxicidade, a migração leucocitária e a hiperalgesia causadas pelos dois venenos testados. Ainda, reduziu o edema causado pelo VBaJ. Já *in vitro*, a FBM induziu a diferenciação e proliferação celular e também reduziu as células apoptóticas e necróticas. Pode-se concluir que, embora ambos os venenos (juvenil e adulto) sejam capazes de causar reações locais, existe diferença na magnitude desses efeitos, tanto *in vivo* como *in vitro*, e o tratamento com a FBM se mostrou benéfico em reduzir essas reações locais induzidas pelos venenos desta serpente.

Palavras-chave: *Bothrops alternatus*, juvenil e adulto, fotobiomodulação, miotoxicidade, citotoxicidade, veneno botrópico.

ABSTRACT

Bothrops snakes are responsible for most snakebites in Latin America. Bothropic envenoming causes both systemic and severe local effects. Furthermore, it is described that venoms from young and adult snakes have differences in their composition, which can lead to differences in the evolution of the local picture. Bothropic antivenom is the treatment of first choice, however, its effectiveness is limited, being able to neutralize only the systemic effects. It has been shown in previous studies that photobiomodulation (PBM) is promising in reducing local effects induced by bothropic snakes. The aim of this study was to expand the knowledge of the actions of low-level laser (LLL) on the local effect, after the action of the snake venom *Bothrops alternatus* (VBa), in its juvenile (VBaJ) and adult (VBaA) stages. For this, *in vivo* experiments were carried out with Balb-C mice and, *in vitro* with C2C12 muscle cells. For the treatment, LLL, 660 nm, 100 mW and 40 seconds of irradiation were used. *In vivo*, the animals were injected with VBaJ or VBaA, or only with saline, and the groups that received PBM, the treatment was conducted 30 minutes after the injection of the venoms. After 6 hours, edema, inflammatory infiltrate, myotoxicity and histology of the gastrocnemius muscle were analyzed, and after 1, 3, 6 and 24 hours, hyperalgesia was analyzed. *In vitro*, C2C12 cells received either VBaJ or VBaA, or culture medium alone, and were immediately irradiated with LLL. After 3 hours of the action of the venoms, cell viability, cytotoxicity, differentiation, membrane potential, proliferation, and cellular apoptosis/necrosis were evaluated. It was observed that, *in vivo*, VBaJ and VBaA, at the applied doses, were able to induce edema, inflammatory infiltrate, hemorrhage, to increase hyperalgesia and to cause myotoxicity and myonecrosis, at different intensities. *In vitro*, the two venoms also caused cytotoxicity, decreased cell differentiation, increased cell proliferation, and also induced apoptosis. Treatment with PBM, *in vivo*, was effective in reducing myotoxicity, leukocyte migration and hyperalgesia caused by the two venoms tested. Furthermore, it reduced the edema caused by VBaJ. *In vitro*, PBM induced cell differentiation and proliferation and also reduced apoptotic and necrotic cells. It can be concluded that, although both venoms (juvenile and adult) are capable to induce local reactions, there is a difference in the magnitude of these effects, both *in vivo* and *in vitro*, and treatment with PBM was shown to be beneficial in reducing these local reactions induced by the venoms of this snake.

Keywords: *Bothrops alternatus*, juvenile and adult, photobiomodulation, myotoxicity, cytotoxicity, bothropic venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Urutu (*Bothrops alternatus*)

Figura 2 – Distribuição de *Bothrops alternatus* na América do Sul e sua categoria de risco por região

Figura 3 – Aparelho de Laser de Baixa Intensidade Therapy XT

Figura 4 – Modo de aplicação do LBI nas placas de experimento

Figura 5 – Modo de aplicação do LBI nos microtubos

Figura 6 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 7 – Diferença entre as proteínas identificadas dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 8 – Efeito da FBM no edema muscular induzido pelos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 9 – Efeito da FBM na migração celular induzida pelos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 10 – Efeito da FBM na miotoxicidade (CK) induzida pelos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 11 – Efeito da FBM na resposta hiperalgésica após a injeção dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 12 – Histologia do músculo gastrocnêmio após a injeção dos venenos da *Bothrops alternatus* e o efeito da FBM

Figura 13 – Efeito dos venenos da *Bothrops alternatus* na viabilidade das células C2C12

Figura 14 – Efeito da FBM na viabilidade das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 15 – Efeito da FBM na citotoxicidade das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 16 – Efeito da FBM na diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 17 – Análise da diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus* e tratamento com a FBM

Figura 18 – Efeito da FBM no potencial de membrana das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 19 – Efeito da FBM na proliferação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*

Figura 20 – Efeito da FBM na apoptose e necrose das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros dosimétricos do LBI

Tabela 2 – Grupos e condições experimentais para os ensaios de Viabilidade celular, Citotoxicidade, Diferenciação celular e Potencial de membrana

Tabela 3 – Grupos e condições experimentais para o ensaio de Apoptose/ Necrose celular

Tabela 4 – Grupos e condições experimentais para o ensaio de Proliferação celular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP – Trifosfato de Adenosina
- BaA – *Bothrops alternatus* adulto
- BaJ – *Bothrops alternatus* juvenil
- BPPs – Peptídeos potenciadores de bradicinina
- BSA – Soro albumina bovina
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CCO – Citocromo C Oxidase
- CFSE – Carboxifluoresceína succinimidyl éster
- CK – Creatina Kinase
- cm² – Centímetro ao quadrado
- CO₂ – Dióxido de carbono
- COX-2 – Ciclooxigenase 2
- CTL – Lectinas do tipo C
- DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- DMSO – Dimetil-sufóxido
- EPM – Erro padrão da média
- FBM – Fotobiomodulação
- g – Grama
- Ga-As – Arseneto de Galium
- H/E – Hematoxilina-Eosina
- HeNe – Laser de hélio-neônio
- IFN-gama – Interferon-gama
- IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

J/cm² – Joules por centímetro ao quadrado

Kg – Kilograma

LAAOs – L-aminoácido oxidases

LBI – Laser de baixa intensidade

LDH – Lactato desidrogenase

LED – Diodo emissor de luz

mg – Miligrama

ml – Mililitro

mm – Milímetro

MMP – Potencial de membrana mitocondrial

mRNA – RNA mensageiro

MTT – (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)

mW – Miliwatts

NaCl – Cloreto de sódio

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

nm – Nanômetro

nM – Nanomolar

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

PGE₂ – Prostaglandina E₂

ph – Potencial hidrogeniônico

PHA – Fitohemaglutinina

PLA₂ – Fosfolipases A₂

PS – Fosfatidilserina

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

SAB – Soro antibotrópico

SABC – Soro antibotrópico-crotálico

SABL – Soro antibotrópicolaquéutico

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMPs – Metaloproteinases de peçonhas de serpentes

SVSPs – Serino proteases de peçonhas de serpentes

TFBM – Terapia de fotobiomodulação

TMRE – Mityochondrial Membrane Potencial-Cayman Chemical

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

VBa – Veneno da serpente *Bothrops alternatus*

VBaA – Veneno da serpente *Bothrops alternatus* adulto

VBaJ – Veneno da serpente *Bothrops alternatus* juvenil

VBm – Veneno da serpente *Bothrops moojeni*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

W/cm² – Watts por centímetro ao quadrado

μg – Micrograma

μm – Micrometro

μL – Microlitro

λ – Comprimento de onda

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

N^o – Número

7AAD – 7-amino-actinomicina D

SUMÁRIO

1. Introdução	20
1.1 – Acidentes ofídicos	20
1.2 – Envenenamento Botrópico	21
1.3 – <i>Bothrops alternatus</i>	22
1.4 – Veneno de serpentes jovens Vs. Veneno de serpentes adultas	24
1.5 – Soroterapia.....	25
1.6 – Terapia com Laser de Baixa Intensidade	26
1.7 – Fotobiomodulação e acidentes ofídicos	28
Justificativa.....	29
2. Objetivos	30
2.1 – Geral.....	30
2.2. – Específicos	30
2.2.1 – <i>IN VIVO</i>	30
2.2.2 – <i>IN VITRO</i>	30
3. Material e métodos	31
3.1 – Venenos da serpente <i>Bothrops alternatus</i> , juvenil e adulto	31
3.2 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
3.3 – <i>IN VIVO</i>	32
3.3.1 – Animais.....	32
3.3.2 – Protocolo de ética	32
3.3.3 – Protocolo de eutanásia.....	32
3.3.4 – Laser de Baixa Intensidade	32
3.3.5 – Quantificação do edema no músculo gastrocnêmio	34
3.3.6 – Migração celular – Total e diferencial.....	34
3.3.7 – Miotoxicidade – Dosagem de Creatina Kinase (CK) plasmática	35
3.3.8 – Hiperalgisia	35
3.3.9 – Análise histológica do músculo gastrocnêmio	36
3.4 – <i>IN VITRO</i>	36
3.4.1 – Células musculares C2C12	36

3.4.2 – Cultivo celular	36
3.4.3 – Laser de Baixa Intensidade	37
3.4.4 – Ensaio de viabilidade celular	40
3.4.5 – Citotoxicidade por liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) .	41
3.4.6 – Ensaio de diferenciação celular.....	42
3.4.7 – Ensaio de potencial de membrana	42
3.4.8 – Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo	43
3.4.9 – Ensaio de apoptose e necrose celular por citometria de fluxo	44
3.5 – Análise estatística	44
4. Resultados	46
4.1 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	46
4.2 – <i>IN VIVO</i>	48
4.2.1 – Efeito da FBM no edema muscular induzido pelos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	48
4.2.2 – Efeito da FBM na migração celular induzida pelos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	49
4.2.3 – Efeito da FBM na miotoxicidade (CK) induzida pelos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	51
4.2.4 – Efeito da FBM na resposta hiperalérgica após a injeção dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	52
4.2.5 – Análise histológica do músculo gastrocnêmio após a injeção dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i> e o efeito da FBM	54
4.3 – <i>IN VITRO</i>	56
4.3.1 – Curva dose-resposta – Efeito dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre a viabilidade das células C2C12	56
4.3.2 – Efeito da FBM na viabilidade das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	57
4.3.3 – Efeito da FBM na citotoxicidade das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	58
4.3.4 – Efeito da FBM na diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	59
4.3.5 – Efeito da FBM no potencial de membrana das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	62

4.3.6 – Efeito da FBM na proliferação das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	64
4.3.7 – Efeito da FBM na apoptose e necrose das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente <i>Bothrops alternatus</i>	66
5. Discussão	68
5.1 – <i>IN VIVO</i>	70
5.2 – <i>IN VITRO</i>	78
5.3 – Veneno da <i>Bothrops alternatus</i> juvenil Vs. adulto	85
6. Conclusão	89
7. Referências Bibliográficas	90
8. Anexo	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Acidentes Ofídicos

Os envenenamentos provocados por serpentes peçonhentas ainda são recorrentes e afetam milhares de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro. Estima-se que 4,5 a 5,4 milhões de indivíduos são picados por ano, onde destes, 2,7 milhões são por serpentes peçonhentas, levando 400.000 a amputações e outras sequelas permanentes e 138.000 à morte ¹. Estes dados epidemiológicos disponíveis, não retratam totalmente, a real situação global dos envenenamentos. Pelo fato de que, uma grande parte das vítimas não procuram ou não tem acesso aos serviços de atenção primária à saúde e aos hospitais, e, também devido a vigilância inadequada no sistema de saúde pública de alguns países, o que leva a subnotificação dos casos ².

Ainda assim, com estes dados disponíveis, é possível observar a alta incidência destes acidentes, sua gravidade e o seu impacto substancial pelo mundo. Devido a estes fatos, e por ser um grave problema de saúde pública, o envenenamento por serpentes peçonhentas foi incluído na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) em junho de 2017 ¹.

A África, Ásia, Oceania e América Latina são as regiões que mais sofrem com este problema, onde os habitantes que moram em regiões rurais mais pobres, com casas mal construídas; agricultores; caçadores; pescadores; povos indígenas; crianças entre 10 e 14 anos que trabalham; gestantes e pessoas com acesso restrito à saúde e à educação, são os mais acometidos por estes acidentes e representam os grupos de maior risco ^{1,2}.

Na América Latina, as serpentes que provocam grande parte dos acidentes ofídicos, pertencem ao gênero *Bothrops*, família *Viperidae* ³. No Brasil, estas são responsáveis por 90% dos acidentes por serpentes peçonhentas no país, sendo consideradas de grande importância médica e epidemiológica ⁴. Segundo os últimos dados epidemiológicos fornecidos pelo Ministério da Saúde, em 2017 houve um total de 28.601 acidentes ofídicos no Brasil, com uma incidência de 13,8/100.000 habitantes e 105 óbitos registrados ⁵. Dados mais

recentes disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), mostram que no ano de 2020 ocorreram 29.728 acidentes ofídicos e 125 óbitos, e deste total, 20.720 casos foram causados pelo gênero *Bothrops* e ocorreram 86 óbitos pelo mesmo ⁶.

1.2 – Envenenamento Botrópico

Há cerca de 30 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, distribuídas por todo o território brasileiro. As espécies mais comuns e frequentes são a *B. neuwiedi*, localizadas em todo território nacional; *B. erythromelas* presentes no Nordeste; *B. atrox* encontradas na região Norte; *B. jararacussu* no cerrado da região central e nas florestas tropicais da região sudeste; *B. jararaca* comuns nas regiões sul e sudeste e a *B. alternatus* encontradas no sul do país ^{4,7}. Estas serpentes vivem em áreas rurais e em periferias das grandes cidades. Elas possuem hábitos noturnos ou crepusculares, e seu pico de atividade é predominantemente em épocas chuvosas. Em virtude disso, elas têm preferência por ambientes úmidos, como matas, áreas cultivadas e por lugares que tenham facilidade para proliferação de roedores ⁴.

Os venenos das serpentes botrópicas são constituídos por diversos componentes, como proteases, fosfolipases, fatores hemorrágicos e peptídeos. Em geral, eles possuem três importantes atividades fisiopatológicas, que são elas: a “ação proteolítica ou necrótica” que ocasiona edema, danos locais e perda tecidual; a ação coagulante responsável por ativação da cascata de coagulação (mecanismo direto ou indireto) resultando na conversão do fibrinogênio circulante em fibrina e, conseqüentemente causando incoagulabilidade sanguínea e a ação hemorrágica onde metaloproteínas e hemorraginas do veneno, agem na membrana basal dos vasos sanguíneos, provocando sua ruptura ^{8,9,10}.

Embora os venenos botrópicos expressem variações em relação à composição e as atividades biológicas, ao serem injetados em humanos ou animais, induzem um quadro fisiopatológico, definido por efeitos sistêmicos e locais iminentes. As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por náuseas, vômito, hematêmese, sudorese, hemorragias distantes da picada como em mucosas e outras cavidades, hipotensão arterial,

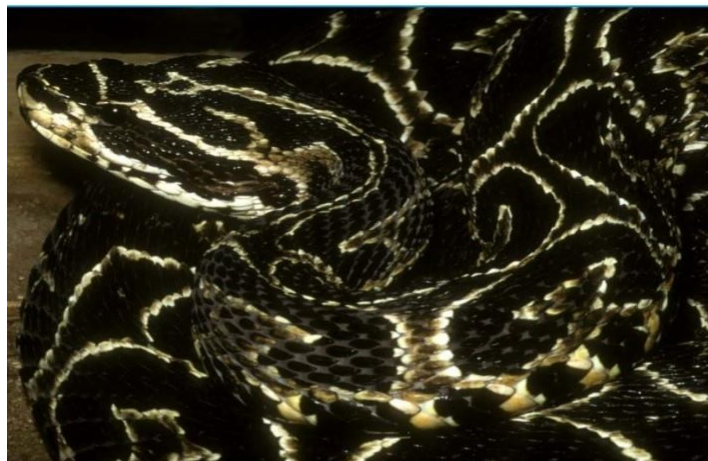
insuficiência renal aguda e ocasionalmente choque. Além de manifestações locais caracterizadas por dor e edema de instalação precoce e caráter progressivo, equimoses, bolhas, hemorragia e, hipóxia que é normalmente acompanhada de necrose tecidual ^{7, 9, 11}.

As principais decorrências dos efeitos locais observadas, são devido à necrose tecidual e infecção secundária, que podem levar à amputação ou ao desenvolvimento da síndrome compartimental, podendo levar à perda funcional do membro acometido. Já, as principais causas de óbitos neste tipo de envenenamento, são ocasionados geralmente, pela insuficiência renal aguda, choque ou também pela coagulação intravascular disseminada ^{7, 11}.

1.3 – *Bothrops alternatus*

As serpentes *Bothrops alternatus* (figura 1) pertencem a família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, gênero *Bothrops* e são conhecidas popularmente como Urutu, Cruzeiro ou Urutu-cruzeiro. Elas são serpentes terrestres, vivíparas, de grande porte, que apresentam corpo robusto e cauda relativamente curta, capazes de atingir cerca de 1.700 mm de comprimento, sendo que as fêmeas desta espécie possuem corpo mais robusto e podem atingir maior tamanho em relação aos machos. Estas serpentes têm preferência por áreas abertas e úmidas, como pradarias, florestas abertas, estuários, pantanais e savanas. Elas possuem hábitos tanto noturnos como diurnos, e se alimentam exclusivamente de mamíferos ^{12,13,14,15}.

Figura 1 – Urutu (*Bothrops alternatus*)



Fonte: Organização Mundial da Saúde / Foto: Mark O'Shea

Esta espécie é amplamente difundida na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil é encontrada nas regiões sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e centro-oeste (Mato Grosso). É considerada de categoria 1 no país, que segundo a OMS, se caracteriza por serpentes de maior importância médica pois são serpentes altamente venenosas que são comuns ou generalizadas e causam inúmeras mordidas, resultando em altos níveis de morbidade, incapacidade ou mortalidade (figura 2) ^{12,16,17}.

Figura 2 – Distribuição de *Bothrops alternatus* na América do Sul e sua categoria de risco por região.



Categoria 1 – maior importância médica (vermelho): Serpentes altamente venenosas que são comuns ou generalizadas e causam inúmeras mordidas, resultando em altos níveis de morbidade, incapacidade ou mortalidade.

Categoria 2 – importância médica secundária (amarelo): Serpentes altamente venenosas capazes de causar morbidade, incapacidade ou morte, para as quais faltam dados epidemiológicos ou clínicos exatos; e/ou são menos frequentemente implicados (devido a seus ciclos de atividade, comportamento, preferências de habitat ou ocorrência em áreas remotas a grandes populações humanas).

Fonte: Organização Mundial da Saúde.

O veneno de *Bothrops alternatus*, assim como de outras espécies do gênero *Bothrops*, possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, com maior

ênfase na atividade proteolítica. Esta serpente é capaz de produzir uma significativa quantidade de veneno, cerca de 380 mg (peso seco), sendo uma quantia bem maior, quando comparado com a de outras espécies como *B. jararacussu*, *B. atrox*, *B. moojeni* e *B. insularis*, que produzem por volta de 200 mg (peso seco) de veneno ^{13, 18,19}.

A peçonha desta serpente, ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que grande parte dela, é composta por proteínas, como as metaloproteinasas (SVMPs), desintegrinas, fosfolipases A2 (PLA2), serino proteases (SVSPs), L-aminoácido oxidases (LAAOs), lectinas do tipo C (CTL) e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) ²⁰. Todas essas toxinas são responsáveis pelas principais manifestações sistêmicas e locais causadas pela peçonha da *Bothrops alternatus*, tais como, ação hemorrágica intensa, desequilíbrio no sistema hemostático e no sistema de coagulação sanguínea, mionecrose e respostas inflamatórias ^{12,20}.

1.4 – Veneno de serpentes jovens Vs. Veneno de serpentes adultas

Os venenos são misturas complexas de diversas toxinas e possuem um papel importante para as serpentes. Suas principais funções são defesa, imobilização, paralisação, morte e auxílio na digestão das presas ²¹.

De acordo com a literatura, podem haver variações na composição do veneno das serpentes jovens e adultas de uma mesma espécie e, conseqüentemente, haver diferenças nas suas atividades biológicas e na sua toxicidade, que levam a diferenças na evolução do quadro clínico da vítima. Estas variações podem ser influenciadas por diversos fatores, como o gênero da serpente, o sexo, habitat, ou o seu desenvolvimento ontogenético ²². A mudança na composição dos venenos e sua evolução, ainda não é completamente compreendido, alguns estudos indicam que a dieta das serpentes é um fator importante para essa alteração, pois algumas espécies no começo de sua vida se alimentam de presas ectotérmicas (lagartos, anfíbios e artrópodes) e, já na fase adulta se alimentam de presas endotérmicas (mamíferos) ^{21,22,23}.

Diversas espécies do gênero *Bothrops* apresentam alteração ontogenética na composição e função de seus venenos. Como por exemplo a *B.*

atrox, *B. asper*, *B. moojeni*, *B. jararaca* (uma das espécies mais estudadas de *Bothrops*), onde os venenos juvenis geralmente causam mais distúrbios de coagulação, enquanto os venenos adultos geralmente têm uma ação proteolítica mais acentuada causando um maior dano tecidual local. Outro ponto que é bastante observado, é de que a letalidade do veneno dessas serpentes também pode variar de acordo com a idade, mesmo que determinadas serpentes tenham uma dieta especializada, como é o caso da espécie *B. alternatus*, que se alimenta exclusivamente de mamíferos durante toda a sua vida ^{24,25,26}.

Segundo Furtado et al. (1991)²² o veneno das serpentes adultas da *Bothrops alternatus* possui um maior teor de proteínas em comparação ao veneno das serpentes jovens desta espécie. Além disso, esse veneno também tem sua toxicidade reduzida dependendo do seu desenvolvimento ontogenético. Para Furtado (2005)²⁷, o veneno das serpentes *Bothrops alternatus* jovens, apresenta intensa atividade fibrinolítica e coagulante sobre o plasma humano, decrescendo conforme estas serpentes se tornam adultas.

O conhecimento e melhor entendimento desta variabilidade na composição dos venenos das serpentes, é fundamental para aprimorar a produção dos antivenenos, para que estes sejam mais específicos e também para melhor compreender os proteomas dos venenos de serpente ^{23,27}.

1.5 – Soroterapia

Atualmente, o tratamento específico utilizado para os envenenamentos por serpentes peçonhentas é a soroterapia, com a administração intravenosa dos antivenenos. Estes, são produzidos por meio da hiperimunização de animais de grande porte, usualmente cavalos, com a inoculação do veneno de uma ou de várias espécies de serpentes para a produção de anticorpos, onde são gerados antivenenos monovalentes ou polivalentes. Para os envenenamentos botrópicos é aplicado nas vítimas o soro antibotrópico (SAB), e na ausência deste, o soro antibotrópico-crotálico (SABC) ou o soro antibotrópico-laquétrico (SABL) ^{4,28}.

Os antivenenos são altamente efetivos em tratar e neutralizar os efeitos sistêmicos causados pelos envenenamentos, no entanto, eles não são capazes

de neutralizar com eficácia as reações locais, e os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, até o momento, não foram esclarecidos. A este respeito, qualquer atraso entre a picada e o início da soroterapia é crucial para um prognóstico crítico destes envenenamentos, pois pode definir uma perda de função ou até mesmo a amputação dos membros acometidos^{4,29,30}. Devido à ausência de proteção dos efeitos locais pelo soro antibotrópico, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes/complementares à soroterapia. Uma das possibilidades que vem sendo estudada, na neutralização dos efeitos locais provocados por venenos botrópicos, é a utilização de fotobiomodulação (FBM), utilizando o laser de baixa intensidade (LBI) ou o diodo emissor de luz (LED).

1.6 – Terapia com 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”. Este dispositivo é dividido em duas categorias: os lasers de alta potência ou cirúrgicos e os lasers de baixa intensidade ou terapêuticos³¹.

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) com o LBI, vem sendo aplicada em diversas áreas da saúde, com o objetivo principal de promover a reparação tecidual, a regeneração de diferentes tecidos e nervos, reduzir processos inflamatórios e gerar analgesia. Estes efeitos que o LBI é capaz de promover, são em decorrência da sua ação bioestimulante, em que a radiação emitida por ele (um feixe de luz monocromático) pode penetrar em camadas mais profundas de tecidos e estimular os fotorreceptores e estes são capazes de absorver fótons de determinados comprimentos de onda provocando uma transformação na atividade funcional e metabólica das células com efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos^{31,32}.

O LBI é um recurso terapêutico não invasivo, que é mais comumente utilizado na luz vermelha ou na infravermelha, com comprimentos de onda entre 600 a 1100 nm e, normalmente, possui uma potência de saída abaixo de 500 mW. Assim, esse dispositivo não provoca a elevação da temperatura no tecido tratado e, desse modo, não causa nenhuma mudança significativa na estrutura

do tecido. Um ponto importante em relação ao LBI são os seus parâmetros dosimétricos, como: o comprimento de onda, energia, a densidade de energia, potência de saída, tempo de irradiação, entre outros; que quando aplicados apropriadamente são essenciais para determinar a eficácia do tratamento ^{33,34}.

O mecanismo de ação da terapia de fotobiomodulação ainda não é totalmente compreendido, em tese, ela age à nível celular, molecular e tecidual ³⁵. Dentro do que já foi estudado, acredita-se que uma das ações do LBI é sobre a membrana plasmática das células e também sobre as mitocôndrias, onde os cromóforos mitocondriais absorvem a luz irradiada pelo LBI. Um desses cromóforos, é a citocromo c oxidase (CCO), que fica situada na cadeia respiratória mitocondrial. A absorção de luz, causa a fotodissociação do óxido nítrico (NO), um inibidor da CCO; o que leva ao aumento da atividade desta enzima, e desencadeia a atividade de outras moléculas de sinalização como as espécies reativas de oxigênio (ROS), íons cálcio, o aumento da síntese de trifosfato de adenosina (ATP), dentre outras; aumentando assim o metabolismo celular. Além disso, há a ativação de diversos fatores de transcrição e, assim, a aceleração da transcrição do DNA ^{34,35}. O LBI ainda aumenta a síntese de colágeno, também pode inibir a cascata do ácido araquidônico e interferir na síntese de prostaglandinas, reforçando sua ação anti-inflamatória, como também promove aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando analgesia na dor não inflamatória ^{31, 36,37}.

Há inúmeros estudos realizados, relacionados à resposta biológica da TFBM, em modelos *in vitro* e *in vivo*. Estes estudos demonstraram que o LBI foi capaz de aumentar a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares, acelerar o processo de cicatrização, reduzir o estresse oxidativo, infiltrado inflamatório e edema, além de promover também analgesia, reparo tecidual, dentre outros ^{31,32}.

Apesar de existir diversos estudos que demonstram os efeitos benéficos do LBI, os dados sobre os mecanismos de ação do laser sobre os tecidos biológicos, ainda não são conclusivos, o que se evidencia a necessidade de estudos adicionais.

1.7 – Fotobiomodulação e acidentes ofídicos

O primeiro trabalho demonstrando uma redução dos efeitos locais provocados pelos venenos botrópicos após o tratamento com a FBM foi o de Dourado et al. (2003)³⁸, que estudaram o efeito da irradiação laser Ga-As (Arseneto de Galium) na mionecrose induzida pelo veneno de serpente *Bothrops moojeni*. Esses autores observaram que o tratamento com esse laser diminuiu consideravelmente a mionecrose, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana plasmática.

Estudos feitos por nosso grupo demonstraram que o tratamento com o LBI e o LED aplicados 30 min e 3 h após a inoculação do veneno de *B. moojeni* e por duas miotoxinas isoladas deste veneno foram efetivos na redução do edema e da hemorragia³⁹. Ademais, outros estudos realizados por nosso grupo demonstraram que o LBI reduz o edema causado pelo veneno de *B. jararacussu* em modelo de inflamação muscular. Além disso, o tratamento conjunto do LBI com o antiveneno botrópico potencializa o efeito observado com o laser por si só, reduzindo o efeito edematogênico do veneno de *B. jararacussu*⁴⁰.

Ainda, foi evidenciado que o LBI, além de inibir o edema e o influxo de leucócitos, também reduziu a alodínia e a hiperalgesia causada pelo veneno de *B. jararacussu*⁴¹. *In vitro*, nosso grupo demonstrou que o LBI protege as células musculares contra o efeito miotóxico do veneno de *B. jararacussu* e ainda promove a diferenciação dessas células⁴².

Recentemente nosso grupo demonstrou que o tratamento com LED aumentou a viabilidade e reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio e do óxido nítrico por macrófagos após incubação com o veneno de *B. jararacussu*, confirmando o efeito protetor da FBM frente a ação inflamatória dos venenos botrópicos⁴³.

Conforme o exposto acima, esses resultados sugerem que a FBM possa ser uma abordagem terapêutica local eficaz em casos de envenenamentos por serpentes botrópicas.

JUSTIFICATIVA

São recorrentes os acidentes que envolvem as serpentes do gênero *Bothrops* no mundo, e a morbimortalidade causada pelo acidente ofídico é um problema de saúde pública que não deve ser ignorado. Os distúrbios da hemostasia e a mionecrose local são as consequências mais comuns decorrentes dos envenenamentos causados pelas serpentes desse gênero e estão relacionadas às perdas da função do membro acometido e à outras complicações graves da ação do veneno. A soroterapia, que é o tratamento preconizado para esse tipo de acidente é ineficaz em neutralizar os efeitos locais causados por esses venenos.

Por esse motivo, a procura por abordagens alternativas às usualmente empregadas, tem sido alvo de interesse e se constituem em medidas relevantes para neutralização e/ou diminuição dos efeitos degenerativos, bem como a aceleração do processo regenerativo. Entre os novos tratamentos alternativos que estão sendo estudados, a TFBM mostra-se uma ferramenta promissora para o tratamento dos efeitos causados por picadas de serpentes botrópicas pois promove uma redução do edema local, hiperalgesia, influxo de leucócitos e mionecrose, além de acelerar a regeneração tecidual após a ação miotóxica do veneno.

No entanto, a literatura demonstra que venenos de serpentes adultas e jovens possuem diferenças em sua composição e isso pode levar a diferenças na evolução do quadro local. Portanto, esta pesquisa poderá fornecer dados adicionais para o entendimento da reação local induzida por venenos de serpente botrópica em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como uma eventual aplicação da fotobioestimulação como terapia coadjuvante a soroterapia.

2. OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Este estudo teve como objetivo geral ampliar o conhecimento das ações do Laser de Baixa Intensidade sobre o efeito local após ação do veneno da serpente *B. alternatus* (VBa), em seus estágios juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA).

2.2 – ESPECÍFICOS

2.2.1 – *IN VIVO*

Através de experimentos com camundongos foram avaliados os efeitos da irradiação do LBI sobre a lesão local induzida pelos venenos, quanto a:

- I – Edema muscular;
- II – Migração celular;
- III – Miotoxicidade;
- IV – Hiperalgisia;
- V – Mionecrose do músculo gastrocnêmio.

2.2.2 – *IN VITRO*

Através de experimentos com mioblastos C2C12 foram avaliados os efeitos da irradiação do LBI sobre a lesão induzida pelos venenos, quanto a:

- I – Viabilidade celular;
- II – Citotoxicidade;
- III – Diferenciação celular;
- IV – Potencial de Membrana;
- V – Proliferação celular;
- VI – Apoptose/necrose celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no biotério, no Laboratório de Cultivo Celular e no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) - SP, no Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde da FIOCRUZ – RO e no Laboratório de Neuromodulação da Dor do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

3.1 – Venenos da serpente *Bothrops alternatus*, juvenil e adulto

Foram utilizados venenos extraídos de vários exemplares juvenis e adultos de serpentes *Bothrops alternatus*, fornecidos gentilmente, pelas Dra. Laura C. Leiva e Dra. María Emilia Garcia Denegri, das Universidad Nacional del Nordeste Corrientes e Facultad de Ciencias Veterinarias – Argentina. Os venenos liofilizados, foram mantidos a 10°C e preparados (p/v) em solução de salina estéril (NaCl 0,9%) ou em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) no momento do uso.

3.2 – Gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

O gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é um método amplamente utilizado em avaliações quantitativas e qualitativas de amostras proteicas. Com a migração das proteínas presentes nos venenos, pode-se identificar a massa molecular destas. Então foi realizado um SDS-PAGE segundo Laemmli (1970)⁴⁴ para análise eletroforética das proteínas dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*. Alíquotas de 20 µg de VBaJ e VBaA foram incubadas com azul de bromofenol 0,02%, mercaptoetanol 10 mM e dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) por 5 minutos a 95°C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) para separação eletroforética das proteínas, utilizando o sistema PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories). Foi aplicado um padrão de peso molecular para referência (*Precision Plus Protein™ Standards*, Bio-Rad Laboratories). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue, por 30 minutos e, em seguida, lavado com solução descorante de etanol e ácido acético (5% e 7%, respectivamente). Foi feita uma fotografia do gel e esta foi analisada através do

software *ImageJ*, gerando a densitometria das bandas visíveis no gel para posterior comparação dos dois venenos (BaJ e BaA).

3.3 – IN VIVO

3.3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C isogênicos, machos e fêmeas, pesando entre 20-25 g, com 45 dias \pm de vida, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo. Os animais foram alocados em caixas plásticas padrão (305×198×134 mm) com cinco camundongos por caixa, com alimento e água *ad libitum*, alojados em biotério, com controle de temperatura (22° a 26° C) e ciclos de 12 horas alternados entre claro e escuro.

3.3.2 – Protocolo de ética

Todos os protocolos de experimentação animal foram aprovados pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Universidade Nove de Julho, São Paulo, sob os números: 8207061118 e 7996170821, e conduzidos de acordo com a Legislação Federal Brasileira (11.794/2008, Decreto nº 6.899/2009).

3.3.3 – Protocolo de eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por doses suplementares dos anestésicos: Ketamina (Dopalen injetável) e Xilazina (Anasedan injetável). Foi feita a administração de 3 vezes a dose descrita nos procedimentos cirúrgicos, ou seja, 300 mg/kg de Ketamina e 30 mg/kg de Xilazina por via intraperitoneal.

3.3.4 – Laser de baixa intensidade

O tratamento foi feito com o LBI modelo: Therapy XT, da marca DMC® (figura 3), utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de λ 660 nm, potência de 100 mW (densidade de potência de 0,33 W/cm²), área do feixe de 0,028 cm², com densidade de energia de 4 J/cm² e tempo de irradiação de 40 segundos (tabela 1). Os animais foram irradiados ou não após 30 minutos da injeção dos venenos e a aplicação foi feita de forma pontual e diretamente no

local em que foi injetado o veneno seguindo o seguinte delineamento: Grupo 1: Controle, animais que receberam somente solução salina (NaCl 0,9%); Grupo 2: animais que receberam o VBaJ; Grupo 3: animais que receberam VBaJ + tratamento com o LBI; Grupo 4: animais que receberam o VBaA e o Grupo 5: animais que receberam VBaA + tratamento com o LBI.

Figura 3 – Aparelho de Laser de Baixa Intensidade Therapy XT



Foto: Luciana Miato

Tabela 1 – Parâmetros dosimétricos do LBI

Therapy XT (DMC®)	
Potência de saída	100 mW
Comprimento de onda	660 nm
Regime	Contínuo
Densidade de Potência	0,33 W/cm²
Área do feixe	0,028 cm²
Densidade de Energia	4 J/cm²
Tempo de irradiação	40 segundos
Modo de aplicação	Pontual

3.3.5 – Quantificação do edema no músculo gastrocnêmio

O VBaJ ou VBaA (50 µg) foi diluído em 50 µL de NaCl 0,9% e inoculado no músculo gastrocnêmio direito de cada animal. Para a quantificação do edema muscular, após 6 horas da injeção dos venenos e tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais e os músculos gastrocnêmio direito e esquerdo (controle) foram dissecados e pesados em balança analítica. O edema foi medido no tecido muscular, pela quantificação do peso muscular molhado, o qual foi expresso como porcentagem do aumento no peso do músculo injetado, comparado com o músculo gastrocnêmio esquerdo (controle). O aumento percentual do volume do músculo, foi calculado da seguinte forma:

$$E (\%) = \frac{V_f - V_i}{V_i} \times 100$$

E (%) = aumento percentual do volume do músculo

V_f = Volume final (peso do músculo gastrocnêmio direito – veneno)

V_i = Volume inicial (peso do músculo gastrocnêmio esquerdo – controle)

3.3.6 – Migração celular – Total e diferencial

O infiltrado leucocitário, foi avaliado no tempo de 6 horas após a injeção de 5 µg dos VBaJ ou VBaA diluídos em 1 mL de NaCl 0,9%, na cavidade peritoneal dos animais. Os leucócitos foram colhidos por lavagem da cavidade com 2 mL de NaCl 0,9%. As alíquotas das lavagens foram centrifugadas por 5 minutos à 800 rpm na Heraeus Fresco 21 Centrífuge. Após a centrifugação, o sobrenadante de cada alíquota foi descartado e o precipitado formado por leucócitos, foi diluído em 500 µL de NaCl 0,9% (diluição primária). Foi retirado 100 µL da diluição primária e realizada uma nova diluição em 900 µL de NaCl 0,9% (diluição secundária). Posteriormente, foi determinada a contagem total de células em câmara Neubauer, após a diluição (1:20, v/v) em solução de Turk (0,2% cristal violeta corado em 30% em ácido acético). Foram então, preparadas câmaras de suta, onde foram colocadas as diluições secundárias por 1 hora, para a sedimentação dos leucócitos nas lâminas. As lâminas foram coradas por Kit Instant Prov e foi realizada a contagem dos leucócitos diferenciais em microscópio biológico binocular, e contadas 100 células, as quais foram

classificadas como células polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios morfológicos convencionais.

3.3.7 – Miotoxicidade – Dosagem de Creatina Kinase (CK) plasmática

Para a avaliação da atividade de CK, os camundongos receberam injeção de 50 µg de VBaJ ou VBaA diluído em 50 µL de NaCl 0,9%, no músculo gastrocnêmio direito e igual volume de NaCl 0,9% no músculo controle. Amostras de sangue foram coletadas 6 horas após a injeção dos venenos e do tratamento. As amostras foram centrifugadas por 25 minutos à 2000 rpm na Heraeus Fresco 21 Centrifuge. Após a centrifugação, o plasma foi separado e armazenado para posterior determinação da atividade de CK, utilizando o Kit diagnóstico (LABTEST CK-NAC). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra MAX, 190 a 340 nm) e expressa em U/L, sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que produz 1 mmol de NADH por minuto nas condições do ensaio.

3.3.8 – Hiperalgisia

A hiperalgisia foi avaliada com o analgesímetro digital (Von Frey eletrônico) da marca Insight, que consiste em um transdutor de força, no qual em sua extremidade há uma ponteira de polipropileno de 0,7 mm² ligado ao aparelho, que faz a leitura da força aplicada no animal convertendo-a em gramas. Foi injetado 1 µg do VBaJ ou VBaA diluído em 50 µL de NaCl 0,9%, no músculo plantar da pata direita dos camundongos e, após 30 minutos foi realizada a irradiação com o LBI nos grupos tratamento. Os camundongos foram colocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente, sobre uma plataforma com fundo de grade. Após um período de aclimatização de 20 minutos, a ponteira foi aplicada perpendicularmente sob a pele do músculo plantar do animal, exercendo uma força crescente até que o animal retirasse a pata como resposta a esse estímulo, e o resultado lido no analgesímetro na hora da retirada, foi registrado. As respostas a esses estímulos foram avaliadas nos seguintes tempos: 0 hora (valor basal – antes da administração do veneno ou salina), 1, 3, 6 e 24 horas após a administração do veneno ou salina. Para a obtenção do escore nociceptivo, foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Score nociceptivo (\%)} = \frac{\text{Score do animal (1,3,6 ou 24h)} \times 100}{\text{Score basal do animal}}$$

3.3.9 – Análise histológica do músculo gastrocnêmio

O VBaJ ou VBaA (50 µg) foi diluído em 50 µL de NaCl 0,9% e inoculado no músculo gastrocnêmio direito de cada animal. Após 6 horas, os animais foram mortos e os músculos gastrocnêmio direito foram dissecados, coletados e colocados em solução fixadora de formol tamponado 10%. Após 24 horas, o material foi lavado e desidratado em soluções sequenciais de etanol. Após a desidratação, os tecidos foram embebidos em resina. Cortes transversais de 4 µm foram efetuados e corados com hematoxilina-eosina (H/E), para análise em microscópio. Após a análise histopatológica dos músculos, procedeu-se a documentação dos resultados obtidos por meio de fotografias tiradas em fotomicroscópio Olympus BX-43 com a câmera fotográfica digital Q-Color 3 da Olympus acoplada ao fotomicroscópio.

3.4 – IN VITRO

3.4.1 – Células musculares C2C12

Foram utilizadas células provenientes da linhagem de mioblastos C2C12. As células foram cultivadas no meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab).

3.4.2 – Cultivo celular

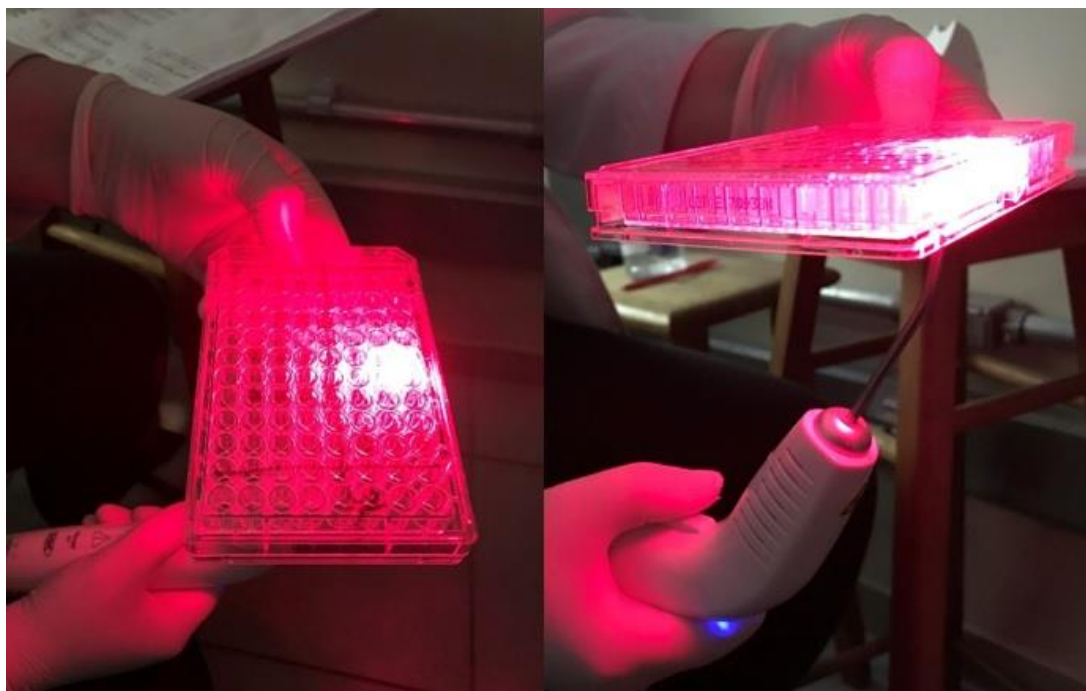
Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, por meio da visualização em microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon). O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular estava subconflente, 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_2HPO_4 8mM; KH_2PO_4 1,4mM; pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e, posteriormente, a ressuspensão em 1 mL de meio DMEM. A viabilidade das células foi realizada por contagem de células viáveis utilizando o corante vital azul de Trypan (0,4%) e utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

3.4.3 – Laser de baixa intensidade

O laser utilizado e seus parâmetros dosimétricos foram os mesmos utilizados para irradiar os animais, conforme descrito no item 3.3.4. Para os experimentos de viabilidade celular, citotoxicidade, diferenciação celular e potencial de membrana, as células foram irradiadas imediatamente após a adição dos venenos na cultura, e a aplicação do LBI foi feita de forma pontual e diretamente no poço pela parte inferior da placa (figura 4). Para estes experimentos, a cultura de mioblastos foi dividida em seis grupos (tabela 2).

Figura 4 – Modo de aplicação do LBI nas placas de experimento



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 2 – Grupos e condições experimentais para os ensaios de Viabilidade celular, Citotoxicidade, Diferenciação celular e Potencial de membrana

Controle	Células C2C12 + Meio DMEM
Controle + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + Tratamento com LBI
VBa Juvenil	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ
VBa Juvenil + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ + Tratamento com LBI
VBa Adulto	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA
VBa Adulto + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA + Tratamento com LBI

Para os experimentos de proliferação celular e apoptose/necrose celular, as células foram irradiadas imediatamente após a adição dos venenos na cultura, e a aplicação foi feita de forma pontual e diretamente na parte inferior dos microtubos (figura 5). Nestes experimentos, a cultura de mioblastos foi dividida em seis ou oito grupos (tabela 3 e tabela 4).

Figura 5 – Modo de aplicação do LBI nos microtubos



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 3 – Grupos e condições experimentais para o ensaio de Apoptose/Necrose celular

Controle	Células C2C12 + Meio DMEM
Controle + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + Tratamento com LBI
VBa Juvenil	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ
VBa Juvenil + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ + Tratamento com LBI
VBa Adulto	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA
VBa Adulto + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA + Tratamento com LBI

Tabela 4 – Grupos e condições experimentais para o ensaio de Proliferação celular

Controle Negativo	Células C2C12 + Meio DMEM
Controle Negativo + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + Tratamento com LBI
Controle Positivo	Células C2C12 + Meio DMEM + Fitohemaglutinina (PHA)
Controle Positivo + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + PHA + Tratamento com LBI
VBa Juvenil	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ
VBa Juvenil + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaJ + Tratamento com LBI
VBa Adulto	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA
VBa Adulto + FBM	Células C2C12 + Meio DMEM + VBaA + Tratamento com LBI

Todos os tratamentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa.

3.4.4 – Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT, por meio da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado. Após a solubilização com DMSO (dimetil-sufóxido), obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis. Primeiramente, foi realizada uma curva dose-resposta, para determinar a concentração e tempo adequados para a realização deste experimento e dos demais nesse estudo. Então, após os procedimentos

de cultivo celular, foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, as células receberam o VBaJ ou VBaA nas respectivas concentrações (5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), ou somente meio de cultura DMEM (controle), com um volume final de 100 μL por poço, imediatamente irradiadas com LBI e incubadas por 1 ou 3 horas. Após a incubação com os venenos, as células foram lavadas com 100 μL de PBS 1X. Em seguida, foram adicionados 50 μL de MTT (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) e incubadas por 3 horas a 37°C a 5% de CO_2 . Terminado o tempo de incubação, a solução foi removida cuidadosamente e foram adicionados 100 μL de DMSO para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm em um leitor de placas (2020, Anthos, Eugendorf, Áustria).

Feita a curva dose-resposta, foi determinada a concentração de 50 μg , e o tempo de 3 horas para a realização do ensaio de MTT e de todos os demais experimentos. Então, após essa determinação, foi realizado um novo ensaio de MTT (seguindo os mesmos procedimentos descritos no parágrafo acima) utilizando 50 $\mu\text{g/mL}$ dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*, no tempo de 3 horas.

3.4.5 – Citotoxicidade por liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

As células musculares C2C12 foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período as células receberam o VBaJ ou VBaA (50 $\mu\text{g/mL}$), ou somente meio de cultura DMEM (controle), com um volume final de 100 μL por poço, foram imediatamente irradiadas com o LBI e incubadas por 3 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas de cada grupo foram colhidos e armazenados em freezer – 80°C. A liberação de LDH foi determinada utilizando o kit LDH Liquiform (Labtest, Minas Gerais, Brasil). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Synergy HT - BioTek) a 340 nm e expressa em U/L, no qual uma unidade é definida como a quantidade de enzima que produz 1 mmol de NADH por minuto nas condições do ensaio.

3.4.6 – Ensaio de diferenciação celular

Para a diferenciação miogênica, após os procedimentos de cultivo celular, foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, foi adicionada a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ do VBaJ ou VBaA nas células ou somente meio de cultura DMEM (controle), com um volume final de 100 μL por poço, e essas foram imediatamente irradiadas com o LBI e incubadas por 3 horas. Decorridas as 3 horas, os mioblastos foram cultivados em meio de diferenciação, utilizando meio de cultura DMEM, contendo 2% de soro de cavalo para induzir a diferenciação, incubados em estufa a 37°C com 5% CO_2 por 4 dias. Durante os 4 dias, foi realizado o acompanhamento da diferenciação dos mioblastos na placa. Uma troca de meio foi realizada no 2º dia e foram feitas fotografias do 1º ao 4º dia, por meio da câmera Prime Cam Metrics 6MP (Prime Life Science) acoplada ao microscópio invertido Eclipse TS-100 (Nikon). As fotografias feitas no 4º dia foram analisadas e a diferenciação dos mioblastos foi determinada pela formação de miotubos, em que foram quantificados em tamanho (diâmetro e comprimento) com o software *ImageJ*. Dez células de campos diferentes foram selecionadas aleatoriamente para cada condição e todos os miotubos de cada célula foram medidos de forma semelhante. O diâmetro médio do miotubo foi calculado como a média de 3 medições feitas ao longo do miotubo.

3.4.7 – Ensaio de potencial de membrana

Foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período as células receberam o VBaJ ou VBaA (50 $\mu\text{g/mL}$) ou somente meio de cultura DMEM (controle), com um volume final de 100 μL por poço, foram imediatamente irradiadas com o LBI e incubadas por 3 horas. Logo após, foi administrado 0,5 μL da solução de TMRE (1%) (Mitochondrial Membrane Potential-Cayman Chemical), um corante sensível, em cada poço. As células ficaram em contato com o corante TMRE por 30 minutos em estufa a 37°, com uma concentração de 1 mmol/L. Transcorrido os 30 minutos, as células foram monitoradas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência Eclipse Ti (Nikon). As imagens obtidas foram analisadas com os softwares *Image Studio Lite Ver 5.2*

(LI-COR) e *ImageJ*, onde foram quantificados a média de intensidade de fluorescência e a média de área das células.

3.4.8 – Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo

Primeiramente foi feita a marcação das células C2C12 com o CFSE (Carboxifluoresceína succinimidyl éster). O CFSE foi diluído em DMSO (segundo instruções do fabricante), protegido da luz. A solução de trabalho foi preparada no momento do uso com 7 μ L de CFSE em 7 mL de PBS 1X a 10% de soro albumina bovina (BSA) estéril, homogeneizada e protegida da luz. Em seguida, adicionou-se 1 mL da suspensão de células (5×10^5 células) em tubo cônico de 15 mL seguido do acréscimo de 1 mL da solução de CFSE. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Transcorrida a incubação, acrescentou-se 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado gelado para bloquear a reação. A amostra foi centrifugada a 4°C por 5 minutos a 600 xg, o sobrenadante desprezado e 2 mL de PBS 1X adicionado para lavagem da amostra, seguida de uma nova centrifugação a 600 xg, 4°C, por 5 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado.

Para o ensaio de proliferação de células C2C12, 5×10^5 de células marcadas com CFSE foram dispensadas em microtubos para cada condição experimental: células que receberam meio RPMI (grupo controle negativo), fitohemaglutinina [PHA] a 5 μ g/mL (grupo controle positivo), VBaJ ou VBaA na concentração de 50 μ g/mL (grupo experimental), em volume final de 300 μ L. Em seguida, as células foram centrifugadas para a formação do precipitado celular, para serem irradiadas de forma pontual no fundo dos microtubos e após o tratamento foram incubadas por 3 horas. Decorrido o tempo de incubação, os microtubos foram centrifugados novamente para a formação do precipitado celular, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado, e incubadas por 72 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Logo após esse período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado 300 μ L de meio RPMI suplementado. Em seguida, foi realizada

aquisição e análise de 80.000 eventos utilizando citômetro de fluxo CytoFLEX S Flow Cytometer (Beckman Coulter). Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo*[™] v10.8 (Becton, Dickinson & Company), a proliferação celular foi avaliada pela presença de picos decrescentes a esquerda no histograma.

3.4.9 – Ensaio de apoptose e necrose celular por citometria de fluxo

A superfície das células saudáveis é composta por lipídios que são distribuídos de forma assimétrica nos folhetos interno e externo da membrana plasmática. Um desses lipídios, a fosfatidilserina (PS), é normalmente restrito ao folheto interno da membrana plasmática e, portanto, apenas exposto ao citoplasma da célula. No entanto, durante a apoptose, a assimetria lipídica é perdida e a PS fica exposta no folheto externo da membrana plasmática. A anexina V liga-se ao resíduo de PS e, então, pode ser usada para detectar PS que está exposta na parte externa das células apoptóticas. E, o 7AAD (7-amino-actinomicina D) entra nas células necróticas. Para o ensaio de apoptose e necrose de células C2C12, 5×10^5 de células em meio de cultura DMEM foram dispensadas em microtubos para cada condição experimental. As células foram centrifugadas para a formação do precipitado celular, em seguida receberam o VBaJ ou VBaA na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou somente meio de cultura DMEM (controle), em volume final de 300 μL , foram imediatamente irradiadas de forma pontual no fundo dos microtubos e incubadas por 3 horas. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação de anexina 1x, onde foram adicionados 3 μL de anexina V – FITC e 0,5 μL de 7AAD (BD Biosciences) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Foram adquiridos 50.000 eventos no citômetro de fluxo CytoFLEX S Flow Cytometer (Beckman Coulter). Os dados obtidos analisados utilizando o software *FlowJo*[™] v10.8 (Becton, Dickinson & Company).

3.5 – Análise estatística

Os resultados obtidos tanto *in vivo* como *in vitro* foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para detectar as diferenças

das médias após a Análise de Variância. O índice de significância considerado aceitável foi de $p < 0,05$. O *software* utilizado para a análise dos dados foi GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). As amostras *in vitro* foram feitas em triplicata e três experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A eletroforese dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*, em condições reduzidas, possibilitou a visualização de 4 grupos com bandas proteicas de aproximadamente 55 kDa, 30 kDa, 24 kDa e 14 kDa (Fig. 6 A). Quando avaliada a densitometria dessas bandas proteicas, constatou-se que os perfis proteicos dos dois venenos se apresentaram de forma semelhante, onde houve uma maior predominância das proteínas de 55 kDa, 30 kDa e 24 kDa no VBaJ em comparação ao VBaA. Porém, a predominância da proteína de 14 kDa foi ligeiramente maior no VBaA quando comparado ao do VBaJ (Fig. 6 B e Fig. 7).

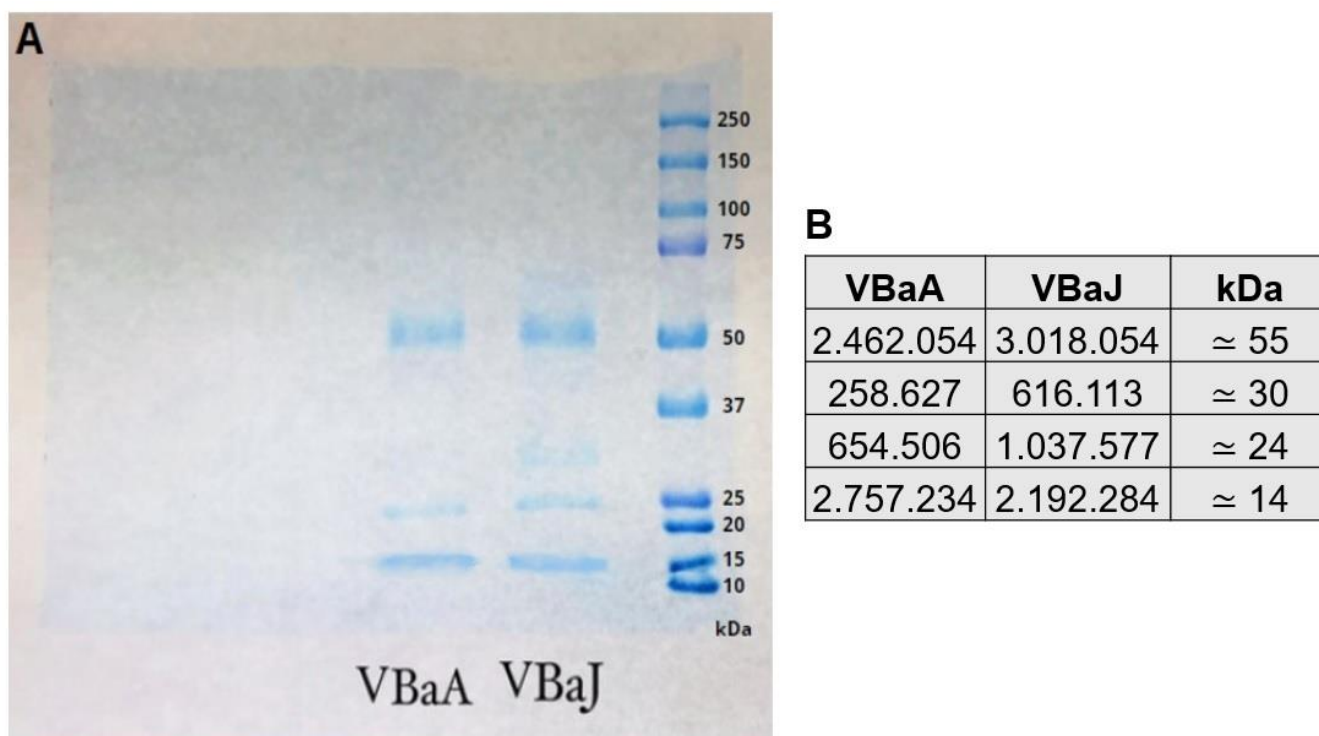


Figura 6 – Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos venenos da *Bothrops alternatus*. Perfil de SDS-PAGE (12%) dos venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *Bothrops alternatus* (20 µg), em condições reduzidas, e seus respectivos perfis proteicos (A). Valores da densitometria das bandas proteicas identificadas dos dois venenos (B).

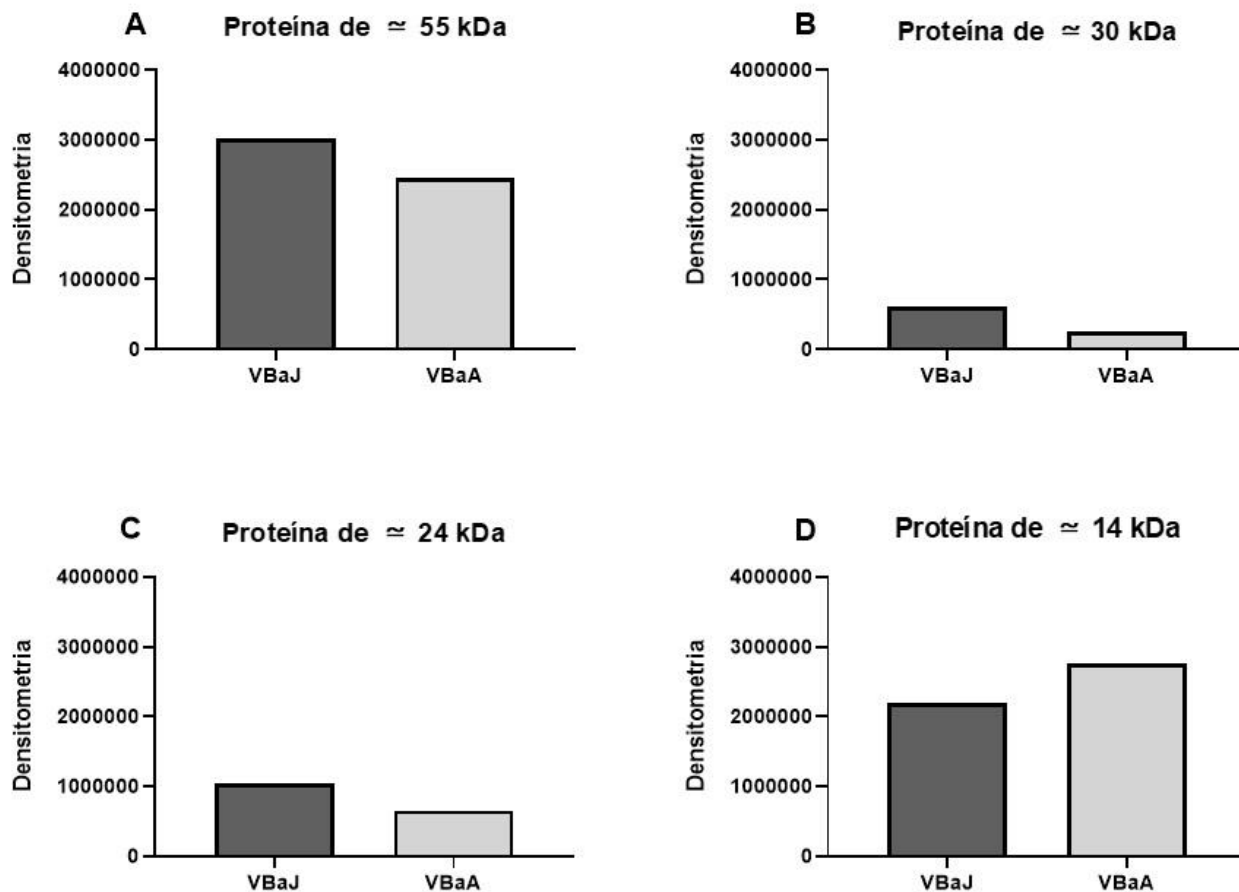


Figura 7 – Diferença entre as proteínas identificadas dos venenos da *Bothrops alternatus*. Gráficos apresentando as diferenças na densitometria das bandas proteicas identificadas (55 kDa, 30 kDa, 24 kDa e 14 kDa) entre os venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *Bothrops alternatus*.

4.2 – IN VIVO

4.2.1 – Efeito da FBM no edema muscular induzido pelos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

Os resultados evidenciaram, que após 6 horas da administração de 50 μ g dos venenos da serpente *B. alternatus* no músculo gastrocnêmio, o VBaJ provocou um edema muscular estatisticamente significativo em comparação ao VBaA, e o tratamento realizado com a FBM após 30 minutos da administração dos venenos no comprimento de onda de 660 nm, foi capaz de reduzir significativamente a formação de edema causada pelo VBaJ, no entanto, ele não foi capaz de reduzir o edema causado pelo VBaA.

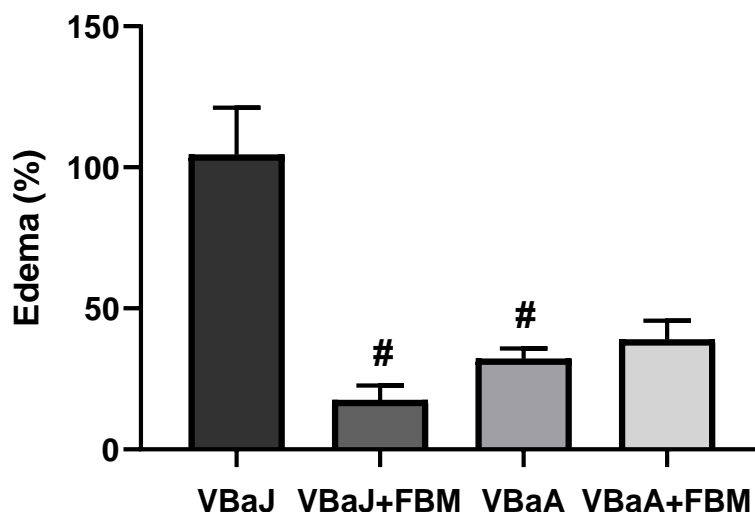


Figura 8 – Efeito da FBM no edema muscular induzido pelos venenos da *Bothrops alternatus*. Os animais foram inoculados no músculo gastrocnêmio com os venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* (50 μ g/músculo) e tratados com a FBM após 30 minutos da injeção dos venenos. Os músculos dos animais foram coletados após 6 horas e o edema foi quantificado através da % peso molhado e expresso como aumento percentual do volume em relação ao músculo esquerdo (controle). Os dados representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo (ANOVA). # $p < 0,05$ em relação ao VBaJ.

4.2.2 – Efeito da FBM na migração celular induzida pelos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A migração celular total e diferencial, foi avaliada após 6 horas da administração de 5 µg dos venenos da serpente *B. alternatus* ou salina estéril (controle) na cavidade peritoneal dos animais. Os resultados demonstraram que tanto o VBaJ como o VBaA estimularam migração de leucócitos, que foram significativamente maiores quando comparados ao grupo controle, e que não houve diferença estatística entre os dois venenos quanto a essa migração total. O tratamento realizado com a FBM no comprimento de onda de 660 nm foi eficaz em reduzir a migração de leucócitos causada por ambos os venenos (Fig. 9 A).

A migração diferencial é caracterizada pela migração de células mononucleares (macrófagos e linfócitos) e células polimorfonucleares (neutrófilos). Observou-se que o VBaJ induziu uma maior migração de células mononucleares em comparação ao grupo controle e, também, em relação ao grupo VBaA. O tratamento com a FBM conseguiu reduzir significativamente essa migração de células mononucleares induzidas pelo VBaJ (Fig. 9 B). Já com relação a migração de células polimorfonucleares, os dois venenos induziram um aumento significativo da migração dessas células, não havendo diferenças entre os venenos. O tratamento com a FBM foi eficaz em reduzir de forma significativa essa migração (Fig. 9 C).

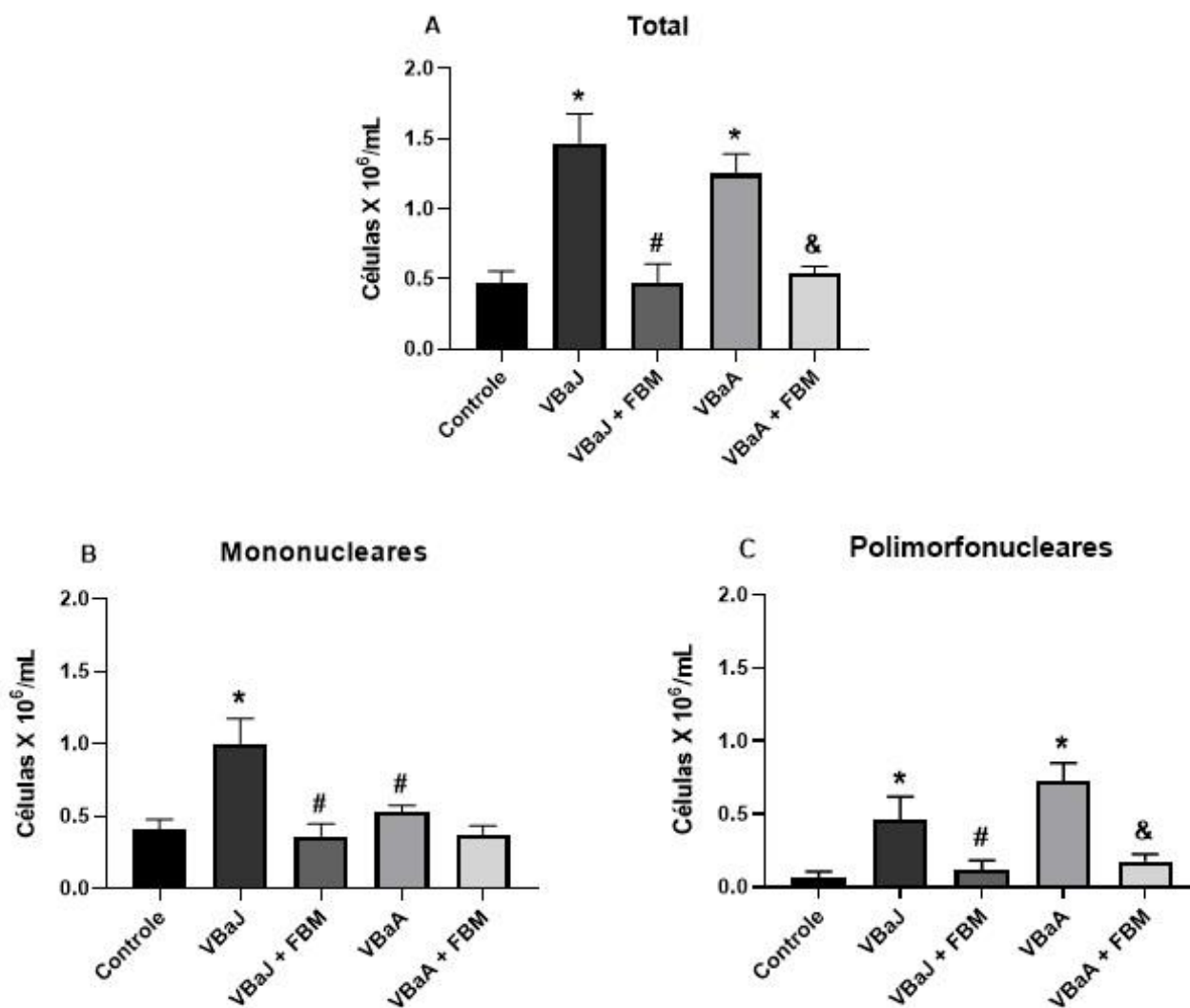


Figura 9 – Efeito da FBM na migração celular induzida pelos venenos da *Bothrops alternatus*. Os animais foram inoculados na cavidade peritoneal com os venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* (5 µg/mL) e tratados com a FBM após 30 minutos da injeção dos venenos. Os leucócitos foram colhidos por lavagem após 6 horas e foram realizadas as contagens total e diferencial das células. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo (ANOVA). * p<0,05 em relação ao controle; # p<0,05 em relação ao VBaJ e & p<0,05 em relação ao VBaA.

4.2.3 – Efeito da FBM na miotoxidade (CK) induzida pelos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A miotoxidade é relatada quando há um aumento dos níveis de CK plasmático. Os resultados demonstraram que houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis de CK sérico nos grupos que receberam 50µg do VBaJ e do VBaA, quando comparados ao grupo controle. O tratamento feito com a FBM, no comprimento de onda de 660 nm, reduziu significativamente a miotoxidade causada tanto pelo VBaJ, quanto pelo VBaA. Observou-se também que não houve diferença significativa entre VBaJ e o VBaA, ambos causaram miotoxidade em proporções similares.

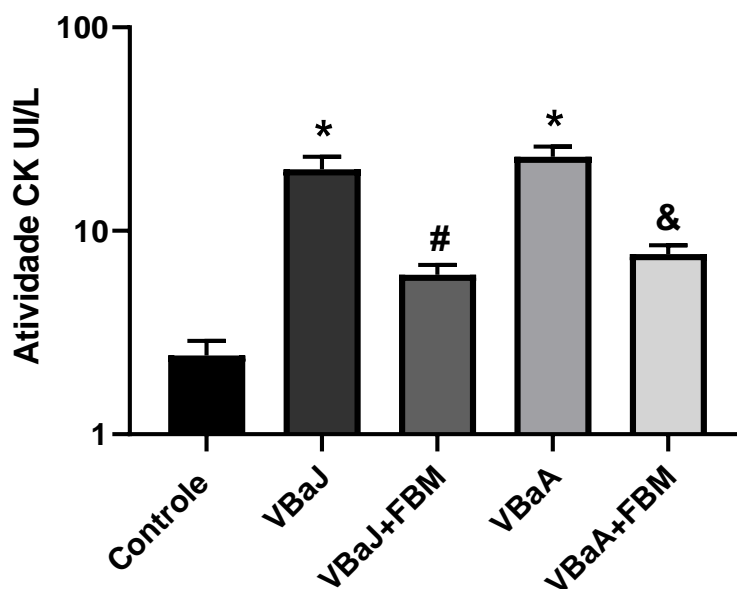


Figura 10 – Efeito da FBM na miotoxidade (CK) induzida pelos venenos da *Bothrops alternatus*. Os animais foram inoculados no músculo gastrocnêmio com os venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* (50 µg/músculo) e tratados com a FBM após 30 minutos da injeção dos venenos. O sangue dos animais foi coletado após 6 horas e a creatina quinase plasmática foi quantificada por meio de kit comercial. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo (ANOVA). * p<0,05 em relação ao controle; # p<0,05 em relação ao VBaJ e & p<0,05 em relação ao VBaA.

4.2.4 – Efeito da FBM na resposta hiperalgésica após a injeção dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A resposta hiperalgésica foi avaliada nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção de 1 µg/50 µL do VBaJ ou VBaA ou de 50 µL de solução salina estéril (controle) no músculo plantar direito de cada animal. Os resultados evidenciaram que tanto o VBaJ como o VBaA induziram uma maior hiperalgesia, ou seja, um aumento da sensibilidade à dor, quando comparados ao grupo controle, em todos os tempos avaliados (Fig. 11 A). Quanto ao potencial no aumento da hiperalgesia, verificou-se que houve diferença estatística entre os dois venenos somente no tempo de 1h (Fig. 11 A).

O tratamento feito com a FBM após 30 min da injeção dos venenos, no comprimento de onda de 660 nm, não reduziu significativamente a hiperalgesia causada pelo VBaJ e VBaA na primeira hora, porém, a FBM mostrou-se eficaz em reduzir significativamente a hiperalgesia causada pelos dois venenos nos tempos de 3, 6 e 24 horas (Fig. 11 B e C).

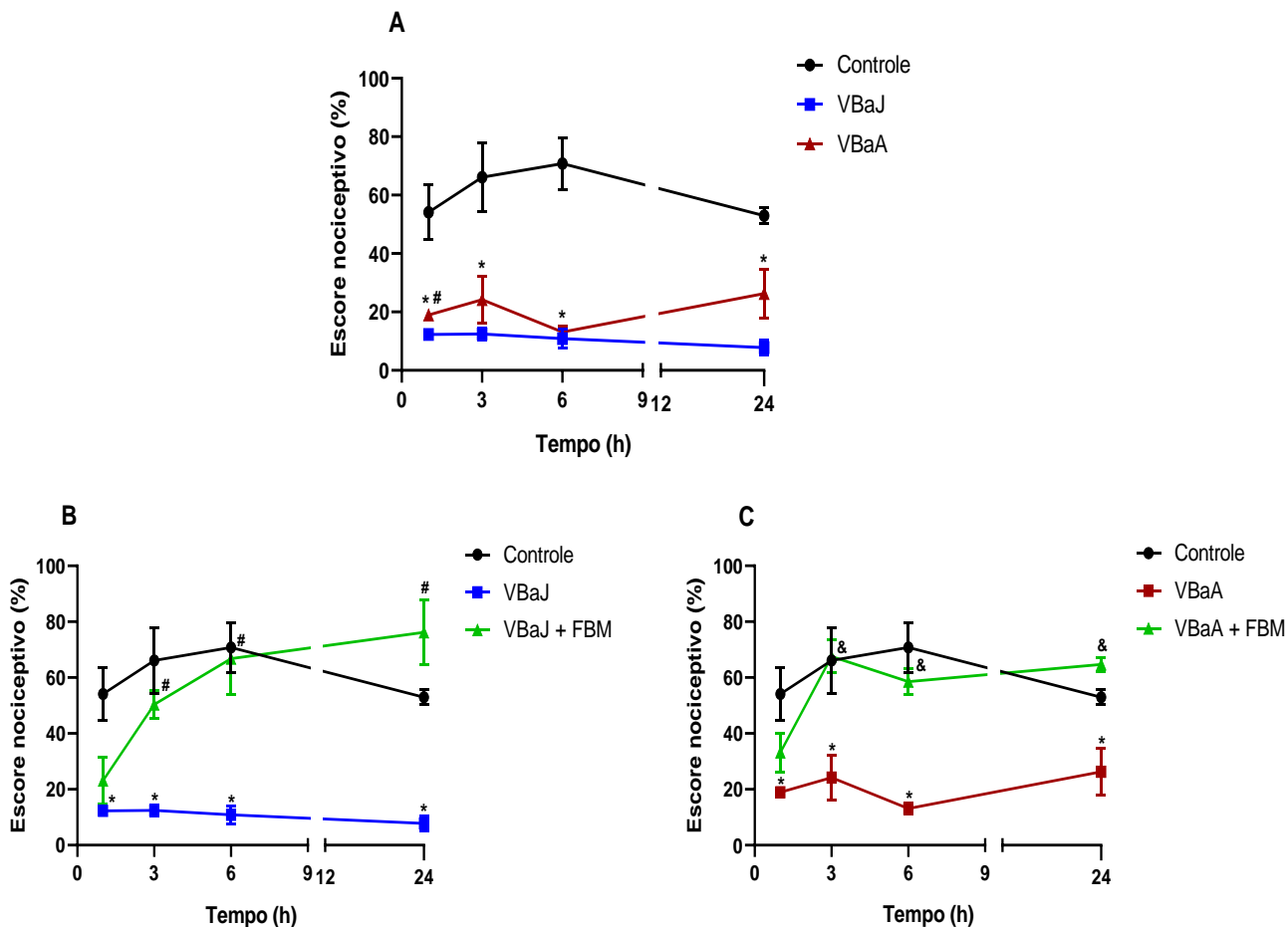


Figura 11 – Efeito da FBM na resposta hiperalgésica após a injeção dos venenos da *Bothrops alternatus*. Os animais foram inoculados no músculo plantar direito com os venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* (1 µg/pata) e tratados com a FBM após 30 minutos da injeção dos venenos. A hiperalgesia foi avaliada nos tempos 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção dos venenos, com analgesímetro digital. Os dados representam a média ± EPM de 4 animais por grupo (ANOVA). (A) * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p < 0,05$ em relação ao VBaJ. (B) * $p < 0,05$ em relação ao controle e # $p < 0,05$ em relação ao VBaJ. (C) * $p < 0,05$ em relação ao controle e & $p < 0,05$ em relação ao VBaA.

4.2.5 – Análise histológica do músculo gastrocnêmio após a injeção dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus* e o efeito da FBM

Após a realização de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos e coloração por H/E, as fotomicrografias evidenciaram que o músculo controle (Fig. 12 A), injetado com 50 µL de salina, apresentou fibras musculares íntegras, com diâmetros regulares e núcleos periféricos e preservação da disposição poligonal das células. Já os músculos que receberam o VBaJ e VBaA (Fig. 12 B e 12 D), na dose de 50 µg, após 6 horas, apresentaram hemorragia extensa (seta), células edemaciadas (E) e desorganizadas, presença de células inflamatórias (triângulo) e de lesões deltas (*) já instaladas, com rompimento das fibras musculares, quando comparados ao músculo controle. Os músculos que foram tratados com a FBM no comprimento de onda de 660 nm (Fig. 12 C e 12 E), evidenciaram uma melhora significativa da reação local provocada pelos venenos juvenil e adulto da *B. alternatus*, com a redução da hemorragia local, células menos edemaciadas, diminuição de células inflamatórias, ausência de lesões deltas e fibras musculares organizadas de modo parecido com as do músculo controle.

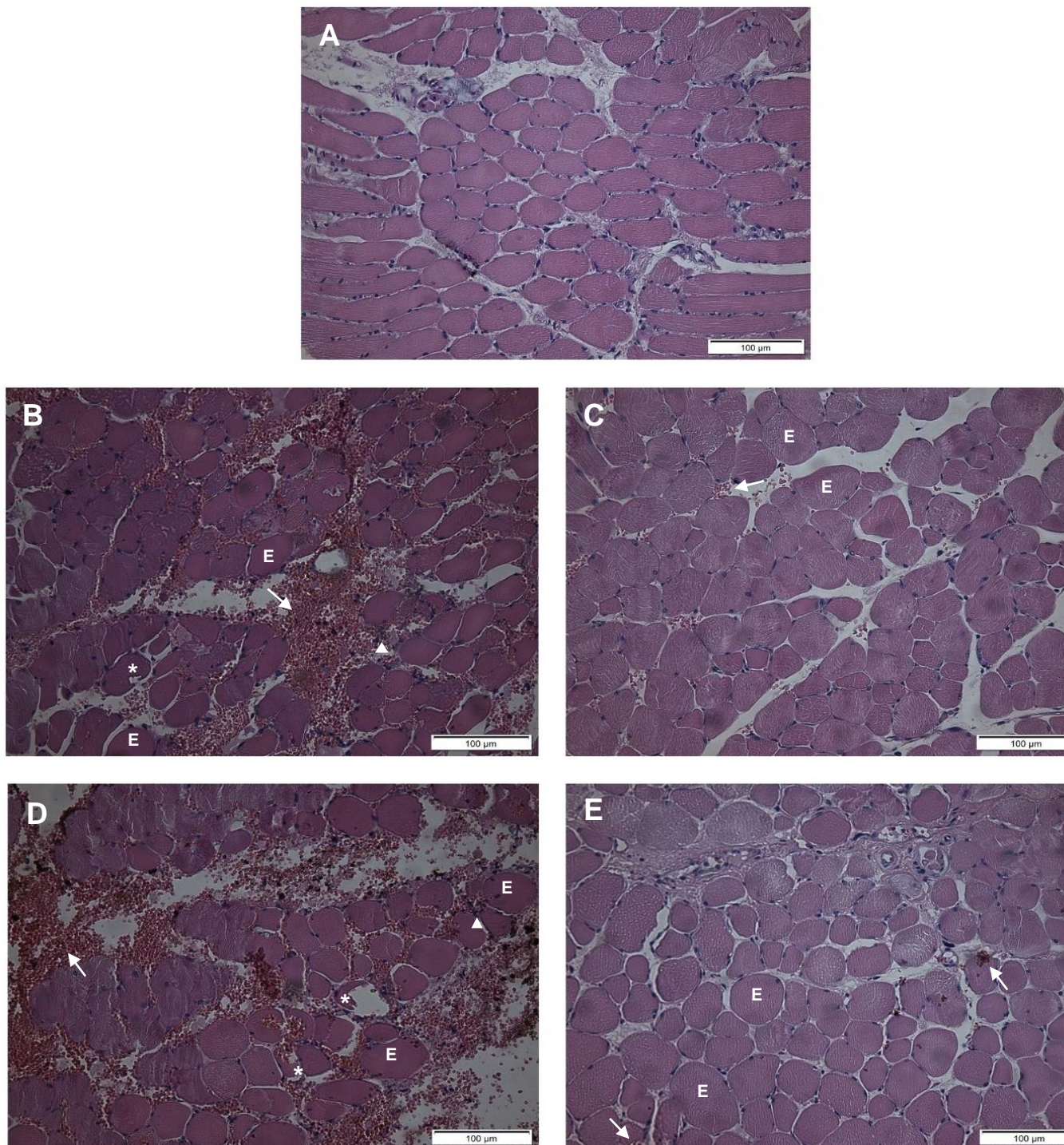


Figura 12 – Histologia do músculo gastrocnêmio após a injeção dos venenos da *Bothrops alternatus* e o efeito da FBM. Fotomicrografias de cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos, 6 horas após a injeção de salina, ou dos venenos juvenil (VBaJ) e adulto (VBaA) da serpente *Bothrops alternatus* e o tratamento com a FBM. (A) Controle (B) 50 µg de VBaJ (C) 50 µg de VBaJ + FBM (D) 50 µg de VBaA (E) 50 µg de VBaA + FBM. (*) Lesões delta, (E) células edemaciadas, (Triângulo) células inflamatórias e (Seta) hemorragia. Barra = 100 µm.

4.3 – IN VITRO

4.3.1 – Curva dose-resposta – Efeito dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus* sobre a viabilidade das células C2C12

A viabilidade celular foi avaliada nos tempos de 1 e 3 horas após a incubação das células musculares C2C12 com o VBaJ ou VBaA, em diferentes concentrações (5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura (controle). Os resultados demonstraram que na primeira hora, as concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ dos dois venenos não causaram alteração significativa na viabilidade celular, somente a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade em comparação ao grupo controle (Fig. 13 A). Já no tempo de 3 horas, todas as concentrações dos dois venenos causaram uma redução na viabilidade das células comparadas com o grupo controle, sendo que esse efeito foi mais evidenciado na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 13 B). Foi observado também, que não houve diferença estatística entre o VBaJ e VBaA, onde ambos causaram uma diminuição na viabilidade das células de modo semelhante nos dois tempos avaliados (Fig. 13 A e B).

Com base nesses resultados, a dose de 50 $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de 3 horas, foram os escolhidos para realizar os experimentos *in vitro* do presente trabalho.

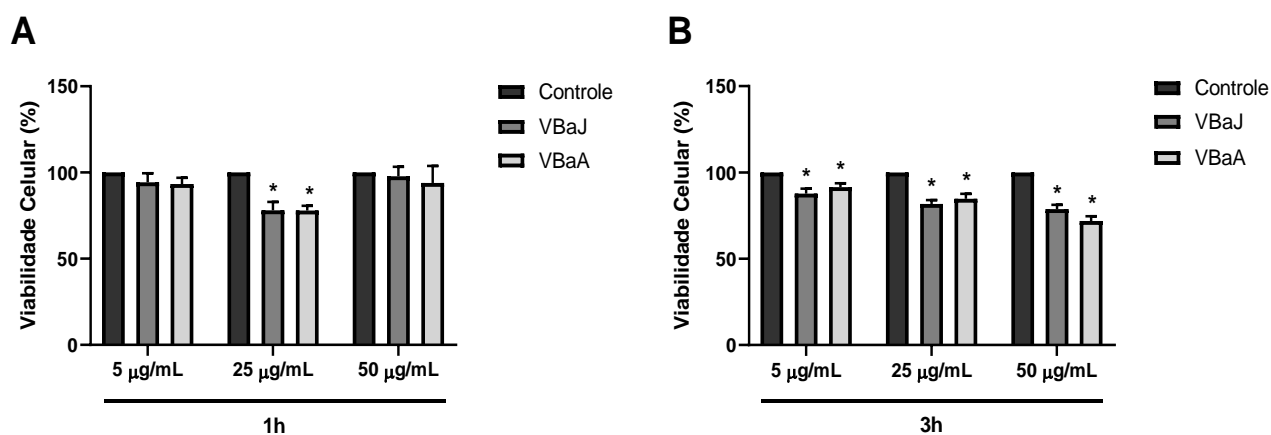


Figura 13 – Efeito dos venenos da *Bothrops alternatus* na viabilidade das células C2C12. Células musculares C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas para adesão celular. Após este período, os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* em diferentes concentrações foram adicionados e as células incubadas por 1 e 3 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Cada valor representa a média \pm SEM de três experimentos independentes (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao Controle.

4.3.2 – Efeito da FBM na viabilidade das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT após as células musculares C2C12 receberem o VBaJ ou VBaA (50 µg/mL) ou meio de cultura (controle), seguido do tratamento com o LBI no comprimento de onda de 660 nm e incubadas por 3 horas. Os resultados evidenciaram que os dois venenos, VBaJ (-) e VBaA (-), causaram de forma similar, uma diminuição significativa da viabilidade das células C2C12 em comparação aos grupos controle (-) e (+). O tratamento com o LBI não foi capaz de reverter a morte celular induzidas pelos venenos.

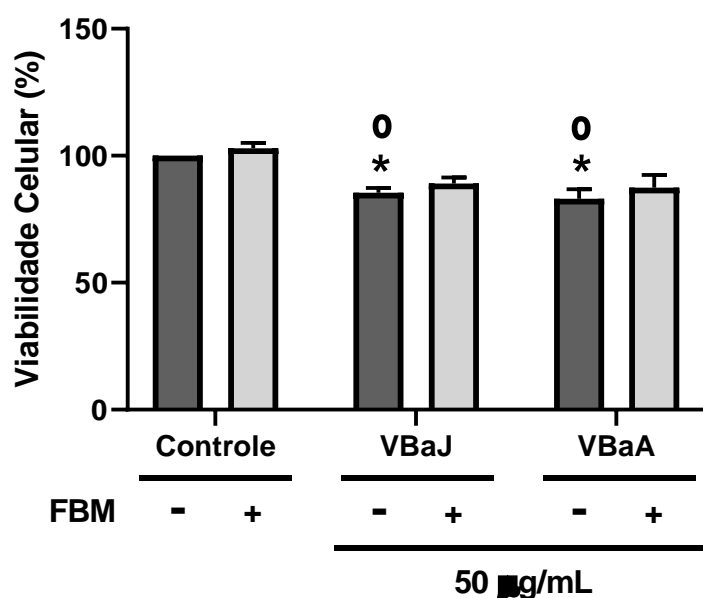


Figura 14 – Efeito da FBM na viabilidade das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas para adesão celular. Após este período, foram adicionados os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus*, ou somente meio de cultura (controle). O tratamento com a FBM foi realizado e as células incubadas por 3 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao Controle (-) e $^{\circ}p < 0,05$ em relação ao Controle (+).

4.3.3 – Efeito da FBM na citotoxicidade das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A enzima LDH está presente no meio intracelular das células C2C12 e, após lesão celular, ocorre a perda da integridade da membrana celular acarretando na liberação desta enzima. Portanto, a citotoxicidade das células C2C12 foi avaliada por meio da liberação da enzima LDH para o sobrenadante, após 3 horas de as células terem recebido o VBaJ ou VBaA e o tratamento com o LBI. Observou-se que os grupos de células que receberam o VBaJ (-) e VBaA (-) apresentaram um aumento significativo dos níveis de LDH no sobrenadante em comparação aos grupos controle (-) e (+) e que os dois venenos causaram esse aumento de modo similar. O tratamento realizado com o LBI mostrou uma tendência em reduzir esses níveis de LDH, porém essa redução não foi estatisticamente significativa.

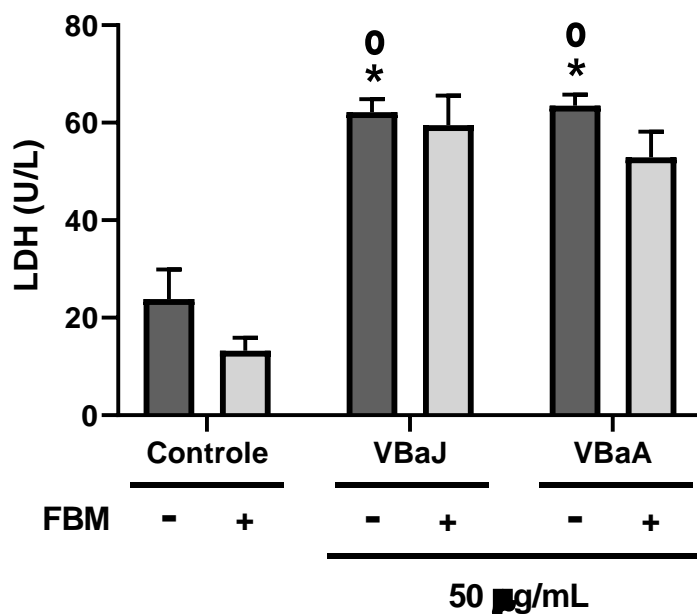


Figura 15 – Efeito da FBM na citotoxicidade das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após este período, foram adicionados os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* ou somente meio de cultura (controle), realizado o tratamento com a FBM e as células incubadas por 3 horas. O sobrenadante foi colhido e a liberação da enzima LDH foi determinada pelo kit LDH Liquiform (Labtest). Cada valor representa a média \pm SEM de três experimentos independentes (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao Controle (-) e ^o $p < 0,05$ em relação ao Controle (+).

4.3.4 – Efeito da FBM na diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

Para avaliar o efeito da FBM na diferenciação (formação de miotubos) das células musculares C2C12 e na proteção destas células após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*, foi adicionado 50 µg/mL destes venenos nas células, ou somente meio de cultura (controle), realizada a irradiação com o LBI e as células incubadas por 3 horas. Após esse período o sobrenadante foi removido e as células receberam meio de cultura contendo 2% de soro de cavalo para induzir a diferenciação e permaneceram em incubadora e acompanhadas durante 4 dias. Os resultados demonstraram que todas as células dos grupos controle (-) e do controle irradiado com FBM (+) conseguiram se diferenciar, onde apresentaram um formato alongado e fino do 1º ao 4º dia (Fig. 16 1A - 1H). A maioria das células dos grupos VBaJ (-) e VBaA (-) morreram e poucas células conseguiram se diferenciar (Fig. 16 2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 3B, 3C e 3D). Porém, as células dos grupos VBaJ e VBaA irradiadas com FBM (+), apresentaram uma morfologia similar às dos grupos controle (-) e controle irradiado (+), apresentando formato alongado e fino, no qual ocorreu menos morte celular e maior diferenciação em relação aos dos grupos que receberam os venenos e não foram irradiadas, principalmente no 4º dia (Fig. 16 2E, 2F, 2G, 2H, 3E, 3F, 3G e 3H).

Quando essas células foram avaliadas através da quantificação da média de diâmetro e do comprimento, foi possível confirmar aumento significativo do diâmetro dos miotubos das células dos grupos VBaJ (-) e VBaA (-) em comparação aos grupos controle (-) e controle irradiado (+). Assim, o tratamento com o LBI foi capaz de reduzir significativamente esse diâmetro em ambos os grupos (Fig. 17 A). Também foi observado que houve uma diminuição significativa do comprimento das células dos grupos VBaJ (-) e VBaA (-) quando comparados com os grupos controle (-) e controle irradiado (+). Neste caso, o tratamento com o LBI também foi eficaz, causando o aumento do comprimento dessas células de forma significativa em ambos os grupos, característico de células em diferenciação (Fig. 17 B). Além disso, verificou-se que não houve diferenças estatística entre os dois venenos, tanto para a média de diâmetro

como para o comprimento das células (Fig. 17 A e B), comprovando os dados anteriormente apresentados na figura 16.

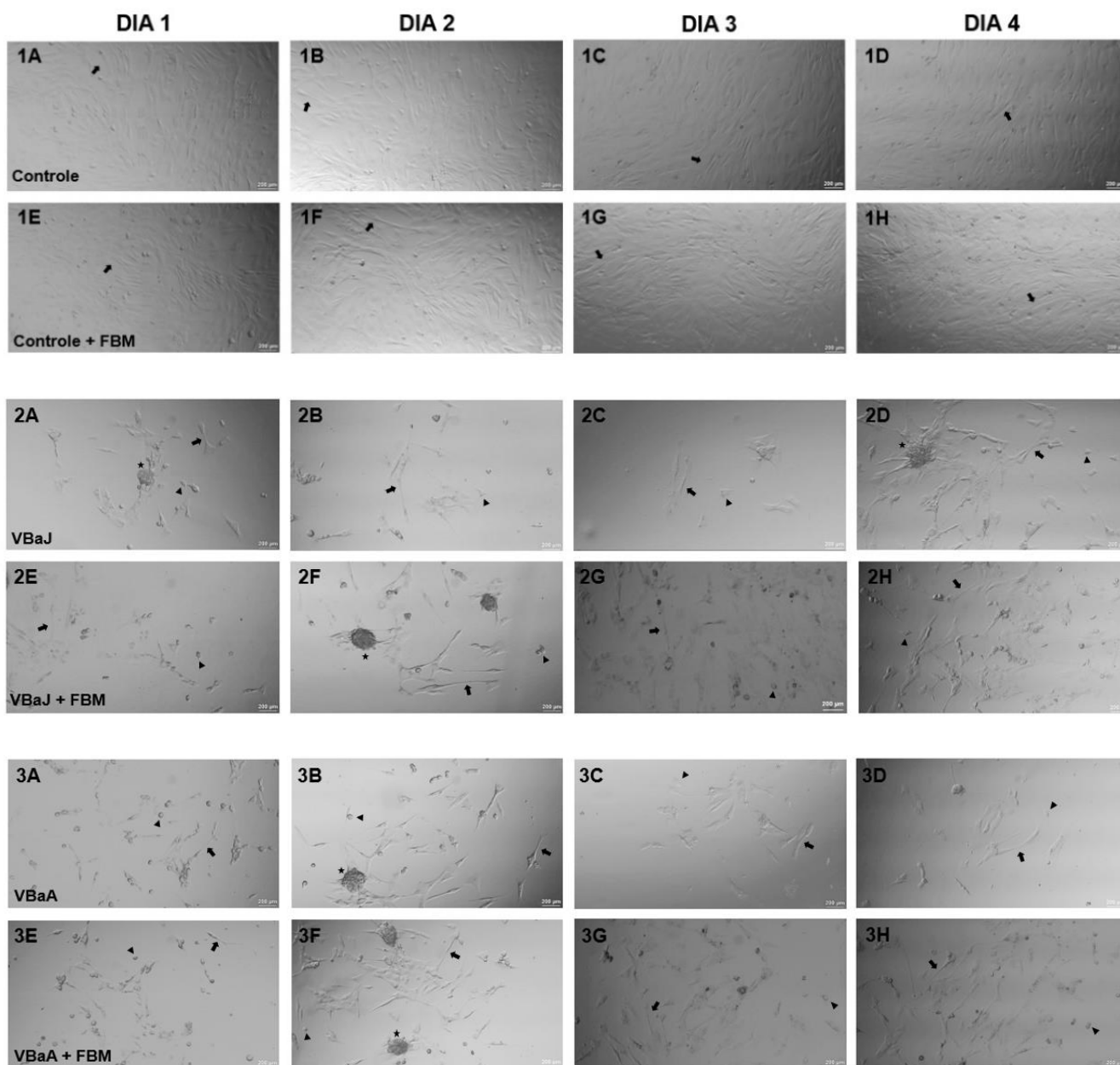


Figura 16 – Efeito da FBM na diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após este período, foram adicionados os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus*, ou somente meio de cultura (controle), foi realizado o tratamento com FBM e as células incubadas por 3 horas. Após esse período, o sobrenadante das células foi removido e substituído por DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo e incubadas por 4 dias. Para determinação da diferenciação celular, foram feitas fotografias dessas células durante os 4 dias e a análise morfológica da formação de miotubos no 4º dia. (Seta) = célula diferenciada, (Triângulo) = célula indiferenciada (Estrela) = aglomerado de células mortas. Barra = 200 µm.

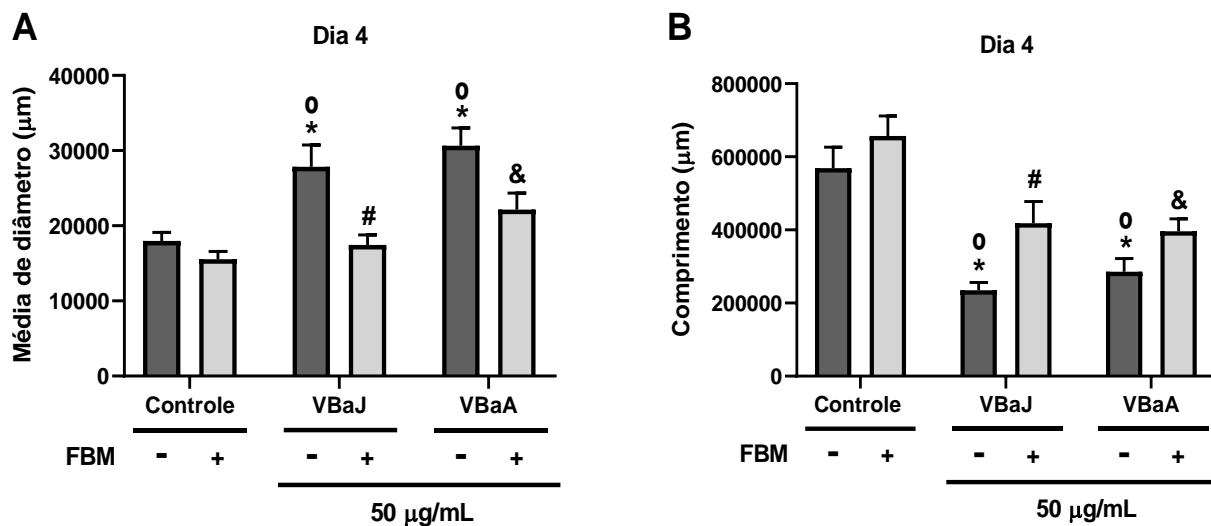
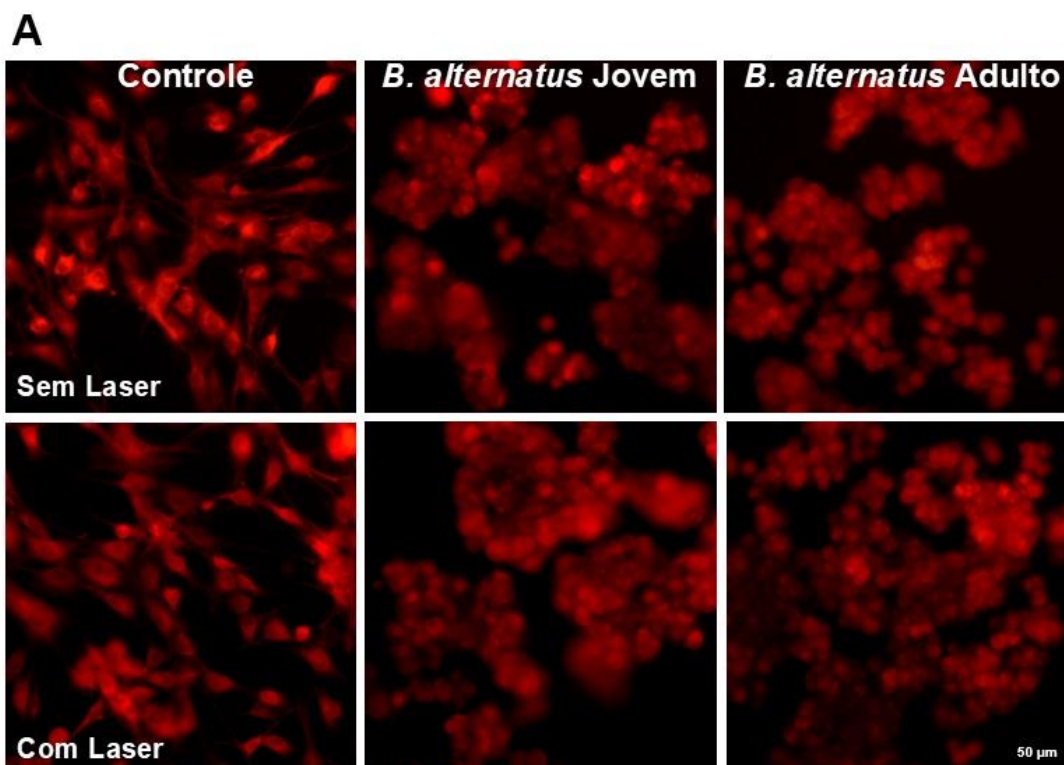


Figura 17 – Análise da diferenciação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus* e tratamento com a FBM. Células musculares C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas para adesão celular. Após este período, foram adicionados os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* ou somente meio de cultura (controle), foi realizado o tratamento com FBM e as células incubadas por 3 horas. Após esse período, o sobrenadante das células foi removido e substituído por DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo e incubadas por 4 dias. Para determinação da diferenciação celular, foram feitas fotografias dessas células durante os 4 dias e a análise quantitativa da média de diâmetro dos miotubos (A) e o comprimento das células (B) no 4º dia. Cada valor representa a média \pm SEM de 10 células selecionadas aleatoriamente (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao Controle (-); ° $p < 0,05$ em relação ao Controle (+); # $p < 0,05$ em relação ao VBaJ (-) e & $p < 0,05$ em relação ao VBaA (-).

4.3.5 – Efeito da FBM no potencial de membrana das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

Para verificar o efeito do LBI no potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos mioblastos após a ação dos VBaJ e VBaA, a média de intensidade de fluorescência mitocondrial (TMRE) foi avaliada e observou-se que não houve diferença significativa na marcação do potencial de membrana entre os grupos analisados (Fig. 18 A e Fig. 18 B).

Durante a avaliação do potencial de membrana foi observado que houve uma mudança na estrutura e tamanho dos mioblastos nos grupos VBaJ (-), VBaJ irradiado com FBM (+), VBaA (-) e VBaA irradiado com FBM (+) em comparação aos grupos controle (-) e controle irradiado com FBM (+). Devido a este achado, também foi avaliada a média de área destes mioblastos, confirmando que realmente houve uma diferença significativa desse parâmetro entre os grupos. Este resultado mostra que tanto o VBaJ, quanto o VBaA provocaram o descolamento dos mioblastos de forma semelhante e a FBM não foi capaz de impedir este descolamento celular provocado pelos venenos (Fig. 18 C).



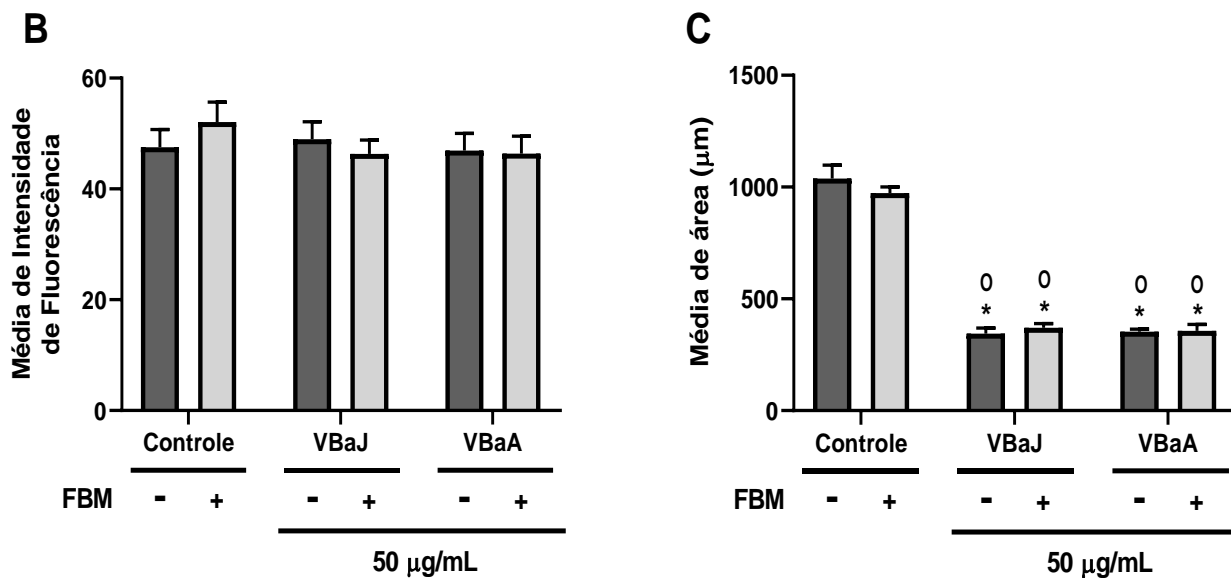


Figura 18 – Efeito da FBM no potencial de membrana das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram incubadas com os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *Bothrops alternatus*, ou somente meio de cultura (controle), foram imediatamente irradiadas com LBI no comprimento de onda de 660nm, e incubadas por 3 horas. Após esse período as células foram marcadas com o TMRE e fotografadas com microscópio de fluorescência. Em (A) as imagens mostram a marcação do potencial de membrana e o descolamento celular das células (Barra = 50 µm). Em (B), o gráfico mostra a média de intensidade de fluorescência nas membranas das células. Em (C), gráfico que mostra a média de área das células. O experimento foi realizado em triplicata e os dados expressos como média ± SEM (ANOVA). *p<0,05 em relação ao Controle (-) e °p<0,05 em relação ao Controle (+).

4.3.6 – Efeito da FBM na proliferação das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

A análise da proliferação das células C2C12 incubadas com VBaJ ou VBaA (50 µg/mL), PHA (controle positivo) ou somente meio de cultura (controle negativo) e tratadas com a FBM foi realizada por meio da marcação com CFSE, um intercalante de DNA, por citometria de fluxo. Os dados experimentais demonstrados por meio dos histogramas, mostraram que todos os grupos, exceto o grupo controle negativo, apresentaram atividade mitogênica, de acordo com os picos decrescentes nos histogramas: verde – zona de mitose e laranja – ausência de mitose (Fig. 19 A, B, C, D, E, F, G e H). O VBaJ (-) induziu atividade mitogênica levemente menor quando comparado ao VBaA (-) (Fig. 19 C e D). Foi possível verificar também que todos os grupos que receberam o tratamento com a FBM apresentaram uma maior atividade mitogênica em relação aos grupos que não receberam o tratamento, demonstrando que o LBI estimulou a proliferação celular (Fig. 19 E,F,G e H).

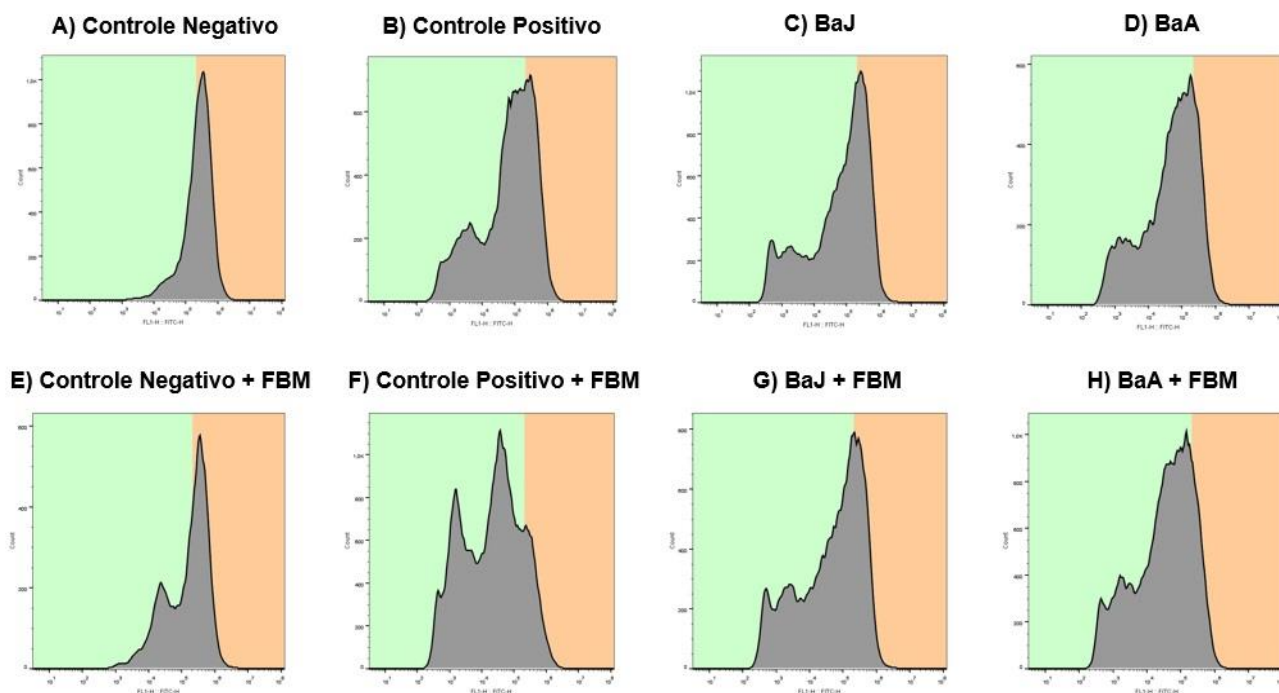


Figura 19 – Efeito da FBM na proliferação das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram marcadas com CFSE e receberam os venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* (50 µg/mL), PHA (controle positivo) ou somente meio de cultura (controle negativo), tratadas com a FBM e incubadas por 3 horas. Após 3 dias foi realizada a análise por citometria de fluxo com aquisição de 80.000 eventos. Os diferentes picos decrescentes observados à esquerda no histograma determinam áreas de presença (verde) ou ausência (laranja) de proliferação celular. Dados representativos de 1N experimental.

4.3.7 – Efeito da FBM na apoptose e necrose das células C2C12 após ação dos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*

As células C2C12 foram incubadas com o VBaJ ou VBaA (50 µg/mL) ou somente meio de cultura (controle), tratadas ou não com a FBM e permaneceram na incubadora por 3 horas. Após esse período, foram coradas com anexina V e 7AAD para avaliar os níveis de apoptose e necrose e a porcentagem de células marcadas foi quantificada. Os resultados mostraram que somente o VBaJ (-) induziu apoptose de maneira significativa se comparado aos grupos controle (-) e controle irradiado com a FBM (+). Também foi possível observar uma maior porcentagem de células apoptóticas em comparação ao VBaA (-) (Fig. 20 A). Já em relação a necrose, foi observado que nenhum dos dois venenos induziu necrose significativa em comparação aos grupos controle (-) e controle irradiado (+) (Fig. 20 B). A irradiação com a FBM não foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de células apoptóticas e necróticas induzidas pelo VBaJ (-). No entanto, a FBM foi eficaz em reduzir significativamente em cerca de 36% e 44% a apoptose e a necrose, respectivamente, induzidas pelo VBaA (-) (Fig 20 A e B).

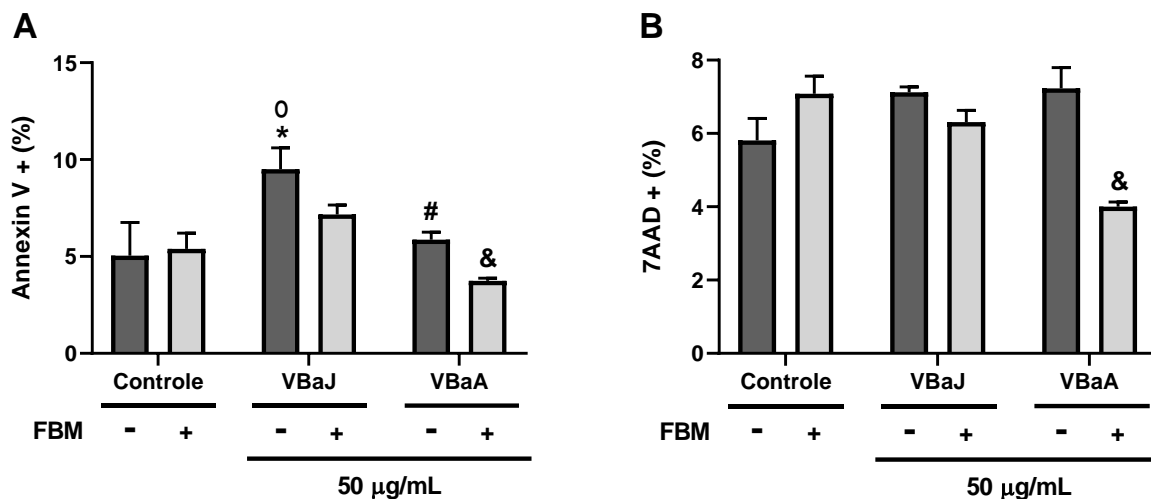


Figura 20 – Efeito da FBM na apoptose e necrose das células C2C12 após ação dos venenos da *Bothrops alternatus*. Células musculares C2C12 foram separadas em microtubos, seguida da adição dos venenos juvenil (VBaJ) ou adulto (VBaA) da serpente *B. alternatus* ou somente meio de cultura (controle), realizado o tratamento com a FBM e as células incubadas por 3 horas. Após esse período, foram coradas com anexina V e 7AAD e analisadas por citometria de fluxo, com aquisição de 50.000 eventos. Em (A), mostra a porcentagem de células apoptóticas. Em (B), mostra a porcentagem de células necróticas. Cada valor representa a média \pm SEM de três experimentos independentes (ANOVA). * $p < 0,05$ em relação ao Controle (-); ^o $p < 0,05$ em relação ao Controle (+); # $p < 0,05$ em relação ao VBaJ (-) e & $p < 0,05$ em relação ao VBaA (-).

5. DISCUSSÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* são consideradas de grande importância médica no Brasil, devido a sua alta prevalência e também em razão das graves sequelas que elas provocam em suas vítimas ⁴. Muitas terapias alternativas têm sido propostas para tratamento das reações locais ocasionadas pelos envenenamentos botrópicos, como a utilização de plantas medicinais, drogas sintéticas, nanocorpos de camelídeos e a fotobiomodulação ^{45,46,47,48}.

A revisão sistemática de Silva et al. (2018)⁴⁸ mostrou que há diversos estudos na literatura, que utilizaram tanto o laser de baixa intensidade como o LED para o tratamento da mionecrose, do processo inflamatório, do edema e da hiperalgesia induzidos pelos venenos botrópicos. Esses estudos mostraram que a fotobiomodulação tem um efeito positivo sobre essas reações locais, onde ela pode modular o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumentando a angiogênese, pode inibir a capacidade do veneno de destruir rapidamente a membrana plasmática, ela também modula as ações de mediadores inflamatórios como a prostaglandina E₂ (PGE₂), interferongama (IFN-gama), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), além de reduzir os níveis de expressão gênica dos receptores B1 e B2 da cinina ⁴⁸.

É descrito que a peçonha das serpentes botrópicas sofre alterações importantes em sua composição no decorrer da vida das serpentes, que podem ser determinantes para a evolução do quadro clínico da vítima de envenenamento ⁴⁹. Investigar essas alterações na composição da peçonha durante o desenvolvimento da serpente e compreendê-las é essencial para auxiliar no desenvolvimento de melhores antivenenos, além de também auxiliar as novas terapias coadjuvantes, como a fotobiomodulação, e desse modo contribuir na melhora do estado de saúde das vítimas.

No presente trabalho foi avaliada a ação do laser de baixa intensidade sobre os efeitos locais causados pelos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*, tanto *in vivo* como *in vitro*, e realizada uma comparação dos dois venenos, para identificar possíveis diferenças entre eles, nas reações locais.

Para um melhor entendimento da complexidade do veneno da espécie *Bothrops alternatus* e os padrões de proteínas presentes no mesmo, bem como as possíveis diferenças nesses padrões entre os venenos juvenil e adulto, foi realizada uma eletroforese em gel de SDS-PAGE, uma técnica que possibilita a resolução do padrão de bandas proteicas dos venenos e permite que seus componentes possam ser separados e identificados⁵⁰. Após a realização do gel e de sua análise, os perfis proteicos de ambos os venenos (VBaJ e VBaA) se apresentaram de forma semelhante em condições reduzidas. Foi possível observar 4 bandas proteicas de aproximadamente 55 kDa, 30 kDa, 24 kDa e 14 kDa. Também foram constatadas variações na densitometria das bandas de um veneno para o outro, onde no VBaJ houve uma maior evidência das proteínas de 55 kDa, 30 kDa e 24 kDa em comparação ao do VBaA, enquanto que no VBaA houve uma evidência levemente maior da proteína de 14 kDa em comparação ao VBaJ. Rocha e Furtado (2005)⁵⁰ e Lanari et al. (2010)⁵¹ também estudaram os padrões de proteínas presentes no veneno das serpentes da espécie *Bothrops alternatus* de diversas regiões do Brasil e da Argentina e verificaram padrões bem similares aos nossos achados. No trabalho de Rocha e Furtado (2005)⁵⁰, os autores utilizaram 62 amostras de venenos de serpentes adultas provenientes do Brasil e dentre essas amostras distinguiram-se 15 bandas proteicas, porém nenhuma amostra possuía todas as 15 bandas. Esses autores averiguaram que destas bandas, 3 foram identificadas em quase todos os venenos, uma com peso aproximado de 55 kDa, outra de 27 kDa e, a última, de 14 kDa; houve uma grande variabilidade de bandas proteicas identificadas entre 30 e 57 kDa. Lanari et al. (2010)⁵¹ também utilizaram venenos de espécimes adultas da *Bothrops alternatus*, porém, de regiões da Argentina, e verificaram que em condições reduzidas, a maior parte das bandas proteicas se encontravam entre 47-32 kDa e 25-16 kDa.

De acordo com a literatura, as proteínas que foram identificadas em nosso gel SDS-PAGE, a de maior peso molecular, de 55 kDa, trata-se possivelmente de uma metaloproteinase PIII, provavelmente a baltergin, que já foi identificada com peso de 55 kDa, e também pode ter uma proporção baixa de LAAOs, que também já foram identificadas com peso entre 50-57 kDa¹². Já, a proteína de peso molecular de 30 kDa, pode ser uma serino protease,

provavelmente a balterobin ou a BthaTL, identificada também com peso de 30 kDa⁵². A proteína de peso de 24 kDa, pode ser a alternagina-C (ALT-C) que contém domínios semelhantes a desintegrina e ricos em cisteína, que possui em torno de 23-28 kDa ou pode ser até mesmo uma lectina do tipo C, a botroalternina, um inibidor da trombina, que possui em torno de 27 kDa¹². Por último, a proteína identificada com peso molecular de 14 kDa, possivelmente seja uma fosfolipase A₂, que conforme o estudo de Ohler et al. (2010)¹², também identificaram fosfolipases A₂ do veneno da *Bothrops alternatus* de 14-15 kDa. Assim, nos venenos deste estudo, evidenciou que o VBaJ apresenta maiores concentrações de metaloproteinase, serino protease e desintegrina/lectina do tipo C, já o VBaA apresenta maior concentração de fosfolipase A₂. Essas diferenças nas concentrações dos constituintes dos venenos podem ser responsáveis pelas diferenças nos efeitos patológicos evidenciados neste estudo.

Todas essas proteínas identificadas, são responsáveis por alguns dos efeitos dos envenenamentos botrópicos. Sabe-se que as metaloproteinases geralmente possuem ação hemorrágica e também são pró e anticoagulante. As serino proteases têm atividade proteolítica e também podem afetar a homeostase pois agem na cascata da coagulação assim como as lectinas do tipo C. Já as LAAOs são citotóxicas e podem induzir apoptose, como também induzir ou inibir agregação plaquetária e, por último, as fosfolipases A₂ que possuem ação miotóxica, Estes efeitos citados, são os principais causados por cada uma dessas toxinas, porém, elas também causam outros efeitos em conjunto^{12,50,24}.

5.1 – *IN VIVO*

Nos envenenamentos botrópicos, em geral, ocorre um extenso processo inflamatório na região afetada, e este mecanismo fisiopatológico tem um papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual e na manifestação de edema, dor e mionecrose^{28,53}.

Os efeitos edematogênicos causados pelas serpentes botrópicas, são provenientes da rápida ação das toxinas presentes no veneno, que agem sobre a microvasculatura, juntamente com a liberação de alguns mediadores

específicos como os eicosanóides e a histamina, que levam a vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular da área afetada ⁵³. As proteínas isoladas do veneno botrópico como as SVMPs e as PLA₂ são as principais responsáveis pela formação de edema. Especificamente, no veneno da *B. alternatus*, as que induzem o edema são a baltergin, uma metaloproteinase (SVMP) hemorrágica e, também uma PLA₂ homóloga à BinTX-I ¹².

Os resultados obtidos em nosso estudo, mostraram que o VBaJ e VBaA na dose de 50 µg, induziram a formação de edema no músculo gastrocnêmio, após 6 horas da injeção dos venenos, e o edema induzido pelo VBaJ foi significativamente reduzido pelo LBI, porém o edema induzido pelo VBaA não foi reduzido com o tratamento. Echeverría et al. (2018)⁵⁴ apresentaram resultados semelhantes aos nossos, onde verificaram a formação de edema pelo VBa adulto, na região subplantar da pata de camundongos, nas doses de 1, 5 e 10 µg, a partir de 30 minutos, e que esse edema persistiu até 6 horas após a injeção do veneno. Utilizando o mesmo protocolo experimental que em nosso trabalho, Barbosa et al. (2008)⁴⁰ descreveram em seu estudo, a formação de edema pelo veneno da serpente *B. jararacussu* no músculo gastrocnêmio. Esses autores verificaram que mesmo irradiando o veneno com o LBI, antes da inoculação no animal, este veneno induziu a mesma quantidade de edema que o veneno não irradiado. Observaram também que o tratamento realizado com o LBI no comprimento de onda de 685 nm e densidade de energia de 4,2 J/cm², foi eficaz na redução de mais de 50% do edema até 24 horas depois da injeção do veneno.

Além disso, Nadur-Andrade et al. (2012)³⁹ relataram em seu estudo, a formação de edema de pata pelo veneno da serpente *B. moojeni*, após 1 hora até 6 horas da inoculação de 1 µg do veneno na região subplantar da pata de camundongos, sendo que o edema teve seu pico máximo na 1^a hora e foi diminuindo gradualmente nas próximas 6 horas e desaparecendo por completo 24 horas depois. Neste estudo, os autores realizaram um protocolo de tratamento com o LBI (685 nm) e LED vermelho (635 nm) e infra-vermelho (945 nm) com 2 aplicações, 30 minutos e 3 horas após a injeção do veneno, e constataram que tanto o LBI como o LED foram capazes de reduzir significativamente o edema da 1^a até a 6^a hora e que não houve diferença entre os efeitos da irradiação com o LBI e os dois LEDs. Tanto Nadur-Andrade et al.

(2012)³⁹, como Barbosa et al. (2008)⁴⁰, não citaram em seus artigos se utilizaram veneno de espécimes adultas ou juvenis de *B.moojeni* e *B.jararacussu*, para uma melhor comparação com nossos resultados, porém, apresentaram achados semelhantes aos nossos em relação ao efeito do LBI.

Após a formação do edema, a ação local subsequente é o recrutamento de leucócitos, células de defesa do organismo, para a área da inflamação. Os leucócitos são classificados como mononucleares ou polimorfonucleares. Os polimorfonucleares são os neutrófilos, basófilos, mastócitos e eosinófilos, que participam da fase aguda da inflamação. Já os mononucleares são os linfócitos e monócitos, que participam da fase crônica da inflamação ^{28,53,55}. O recrutamento de neutrófilos para a área inflamada, é o efeito local mais observado nesse tipo de envenenamento ⁴⁰.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que houve um aumento significativo da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais, após 6 horas da injeção de 5 µg dos venenos juvenil e adulto da *B. alternatus*. Notou-se que após 6 horas da injeção de VBaA houve uma predominância de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos e, no VBaJ houve uma predominância de leucócitos mononucleares em comparação ao controle. A terapia de fotobiomodulação com o LBI teve um efeito positivo sobre a migração celular causada pelos dois venenos (VBaJ e VBaA) reduzindo significativamente tanto os leucócitos totais, como os leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, que foram induzidos pelo VBaJ e, também reduzindo os leucócitos totais e os polimorfonucleares induzidos pelo VBaA, sugerindo que houve uma redução da reação inflamatória provocada por ambos os venenos. Echeverría et al. (2018)⁵⁴ realizaram um protocolo semelhante ao nosso, utilizando o VBa adulto e observaram o aumento do número de leucócitos totais da 1ª até a 6ª hora após a injeção do veneno e a predominância de células polimorfonucleares, principalmente na 3ª e 6ª hora, corroborando os nossos achados. Barbosa et al. (2008)⁴⁰ observaram que o veneno da serpente *B. jararacussu* induziu um aumento do infiltrado inflamatório, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), no músculo gastrocnêmio, após 24 horas da injeção do veneno. Esses autores realizaram um protocolo de tratamento com o LBI, no comprimento de onda de 685 nm, dose de 4,2 J/cm² e

tempo de irradiação de 29 segundos com 4 aplicações, nos tempos 0, 1, 3 e 12 horas após a injeção do veneno, e verificaram que o LBI reduziu significativamente os leucócitos totais e os polimorfonucleares e, aumentou o número de leucócitos mononucleares após 24 horas, corroborando, em parte, os nossos resultados.

Barbosa et al. (2008)⁴⁰ sugerem em seu estudo, que o LBI possa ter modulado as ações de mediadores pró-inflamatórios, como foi mostrado por Safavi et al. (2007)⁵⁶ e, conseqüentemente, isso pode ter reduzido o número de células inflamatórias no local da injeção do veneno, o que pode ter ocorrido também em nosso estudo, uma vez que, Echeverría et al. (2018)⁵⁴ mostraram que o VBa adulto elevou os níveis das citocinas interleucina-1 (IL1), IL-6, interleucina-12 (IL-12) e do TNF- α liberadas por células Raw 264.7 e por macrófagos peritoneais. Assim, o LBI em nosso estudo, pode ter tido uma ação moduladora sobre as células reduzindo a liberação dessas citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Echeverría et al. (2018)⁵⁴ averiguaram que as alterações na permeabilidade vascular, no edema e no infiltrado inflamatório causados pelo VBa adulto ocorrem devido a ação de citocinas e de enzimas chave, como a cPLA_{2 α} e ciclooxigenase-2 (COX-2) que modulam essas ações. Além do mais, esses autores mostraram que o VBa adulto também estimulou as vias de sinalização celular pró-inflamatórias induzindo a liberação de mediadores lipídicos, mesmo com baixa quantidade de PLA₂ em sua composição. A literatura demonstra que venenos botrópicos induziram a inflamação e edema, por meio do aumento dos níveis de PGE₂ via expressão de COX-2^{57,58}. Assim, o LBI em nosso estudo, pode ter inibido a expressão da COX-2 e conseqüentemente ter diminuído os níveis de PGE₂, colaborando na redução do edema e inflamação. Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos para averiguar essa possibilidade, como também para analisar o efeito do LBI sobre a liberação de mediadores lipídicos que contribuem no processo inflamatório provocado pelo VBa adulto.

A miotoxicidade é uma das reações locais mais relevantes no envenenamento botrópico. Estudos têm demonstrado que a miotoxicidade causada pelo veneno da *B. alternatus* é relativamente mais baixa em comparação à de outras espécies do gênero *Bothrops*, como a da *B. jararacussu*

onde a mionecrose é o dano local mais observado após inoculação do veneno desta serpente devido ao fato, de seu veneno possuir uma grande quantidade de miotoxinas^{59,60}. O veneno da *B. alternatus* possui baixa atividade de PLA₂ e uma alta quantidade de SVMPs de classe P-III. Em sua composição as SVMPs são consideradas as principais responsáveis pela letalidade deste veneno, pois desencadeiam hemorragia, edema, distúrbios da coagulação e dano tecidual, a mionecrose^{20,59}.

Após análise dos resultados obtidos em nosso estudo, observou-se que os venenos juvenil e adulto da *B. alternatus* causaram uma miotoxicidade relevante, com o aumento estatisticamente significativo da atividade da CK após 6 horas da inoculação de 50 µg dos venenos no músculo gastrocnêmio. O nosso protocolo realizado com o LBI, foi eficaz em reduzir consideravelmente essa miotoxicidade causada pelos dois venenos desta serpente. Denegri et al. (2016)⁶¹ utilizaram em seu estudo, doses de 50 e 100 µg do VBa adulto e avaliaram a miotoxicidade nos tempos de 3, 6 e 24 horas após a inoculação deste veneno em camundongos. Esses autores observaram resultados semelhantes aos nossos e, evidenciaram um efeito dose-dependente com o pico principal da atividade do CK no tempo de 6 horas. Constataram também que essa atividade foi reduzida significativamente após 24 horas da injeção do veneno. Lauria et al. (2020)⁶², Doin-Silva et al. (2009)⁶³ e Dourado et al. (2003)³⁸, avaliaram o efeito dos lasers de hélio-neônio (HeNe) e de diodo semiconductor AlGaAs sobre a miotoxicidade causada pelos venenos das serpentes *B. leucurus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, respectivamente, e mostraram que a FBM também reduziu de forma significativa a mionecrose causada por estas serpentes, tendo um efeito mioprotetor desde as primeiras horas após a injeção dos venenos. Lauria et al. (2020)⁶² observaram também que a *B. leucurus* teve o pico da atividade do CK às 3 horas após o veneno e, que, às 6 horas, os grupos irradiados com o laser, apresentaram aumento tardio da atividade da CK, sugerindo que houve um efeito retardador da ação miotóxica deste veneno. Já Dourado et al. (2003)³⁸ verificaram que o veneno da *B. moojeni* teve o pico da atividade do CK às 12 horas após a injeção do veneno e as 24 horas essa atividade havia diminuído e o laser foi capaz de diminuir a mionecrose tanto em 12 como 24 horas depois da injeção do veneno, mostrando que o tempo e o

tratamento foram fatores independentes e que não existiu sinergismo entre os dois na resposta muscular. Estes autores, com base em outros estudos, também indicaram que a FBM se mostrou preventiva e retardadora do processo mionecrótico e, que, por ela conseguir induzir a angiogênese via expressão de VEGF e reduzir o estresse oxidativo, que esses fatores também podem ser associados a redução da mionecrose e regeneração do músculo lesado ^{62,63}.

A dor é outra característica marcante apresentada pelas vítimas nos envenenamentos botrópicos, em decorrência da lesão tecidual ocasionada pelas PLA₂, SVMPs e SVSPs existentes no veneno ⁶⁴. Segundo a literatura, a hiperalgesia no local da lesão, é devido a ação dessas toxinas do veneno, que agem sobre componentes celulares, levando a ativação direta de nociceptores ou a liberação de mediadores químicos como a citocinas pró-inflamatórias, que acabam causando uma sensibilidade nas fibras nervosas e conseqüentemente acabam reduzindo seu limiar nociceptivo. De acordo com estudos, a hiperalgesia é mediada principalmente pelos eicosanóides, por bradicinina, aminas vasoativas e citocinas ⁵³.

Nossos achados demonstraram que tanto o veneno juvenil como o de adulto da *B. alternatus*, na dose de 1µg/pata, reduziram significativamente o limiar nociceptivo dos animais; causaram uma maior hiperalgesia, quando foram comparados ao grupo controle, em todos os tempos avaliados, desde a 1ª hora até 24ª hora após a inoculação dos venenos. A FBM com o LBI, reduziu de forma significativa a hiperalgesia causada pelos dois venenos, aumentando o limiar nociceptivo dos animais, nos tempos de 3, 6 e 24 horas após a injeção dos venenos, alcançando um score nociceptivo bem próximo dos animais do grupo controle. Mamede et al. (2016)²⁹ analisaram a hiperalgesia induzida pelo veneno da *B. alternatus* em ratos, nas doses de 5, 15 e 30 µg e verificaram que somente a dose de 30 µg induziu uma hiperalgesia significativa (em torno de 25%), que persistiu durante 24 horas após a injeção do veneno. Quando comparado ao nosso estudo, a diferença da resposta hiperalgésica em relação a dose, pode ser explicada pela diferença de modelo experimental animal, pois utilizamos camundongos em nosso protocolo e, eles, utilizaram ratos. Mamede et al. (2016)²⁹ mostraram também, que a hiperalgesia induzida pelo VBa é de fato provocada pelas PLA₂, SVMPs e SVSPs. Nadur-Andrade et al. (2016)⁶⁵

avaliaram o efeito do LBI sobre a hiperalgesia induzida pelo veneno da serpente *B. moojeni* (VBm), na dose de 1µg/pata, nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas, semelhante ao nosso estudo. O protocolo que utilizaram para analisar a hiperalgesia, foi por filamentos de Von Frey com forças de flexão de 0,692g e 1,202g (filamentos de 3,84 e 4,08). Esses autores utilizaram o LBI no comprimento de onda de 685 nm, dose de 2,2 J/cm², irradiação de 15 segundos com 2 aplicações, uma depois de 30 minutos da injeção do veneno e a outra após 3 horas da injeção. Também observaram que o LBI conseguiu reduzir a hiperalgesia causada pelo VBm, avaliada pelo filamento de 3,84, em todos os tempos avaliados. Já para o filamento 4,08, o LBI conseguiu reduzir a hiperalgesia somente na 3^a hora. Nadur-Andrade et al. (2016)⁶⁵ também mostraram em seu estudo, que o LBI foi capaz de diminuir a ativação do nociceptor na medula espinhal, modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, tanto no local da injeção como na medula espinhal e, também, reduziu a expressão dos níveis de mRNA das quininas B1 e B2, indicando que todos esses efeitos contribuíram para a redução da hiperalgesia provocada pelo VBm, uma vez que tanto os mediadores inflamatórios quanto a bradicinina têm um papel importante nos efeitos hiperalgésicos do veneno. Esses achados corroboram os que foram observados por Mamede et al. (2016)²⁹, de que a bradicinina tem uma participação significativa na hiperalgesia induzida pelo VBa, além de outros mediadores químicos. Diante desses resultados, podemos sugerir que o LBI possa ter exercido o mesmo efeito sobre os mediadores inflamatórios e a expressão de quininas B1 e B2 com o veneno da *B. alternatus*, culminando na redução da hiperalgesia causada por este veneno. Entretanto, são necessários estudos adicionais para melhor compreender o mecanismo de ação do LBI em relação a hiperalgesia induzida pelo VBa.

Além disso, no estudo de Nadur Andrade et al. (2016)⁶⁵ e no de Mamede et al. (2016)²⁹, não foram mencionados se os venenos utilizados eram de espécimes juvenis ou adultas da *B. moojeni* e da *B. alternatus*, o que dificultou uma melhor comparação aos nossos resultados.

Em nosso trabalho também foi avaliado qualitativamente, a presença de hemorragia, lesão tecidual, infiltrado inflamatório e edema nas lâminas

histopatológicas dos músculos gastrocnêmio que receberam os venenos juvenil e adulto da *B. alternatus*, na dose de 50 µg. Com base nesta avaliação, foi observado que os dois venenos induziram uma intensa hemorragia além de lesão tecidual, com a presença de lesões delta; corroborando com os resultados bioquímicos de atividade da CK. Além disso, os venenos estimularam a migração celular observada pela presença de células inflamatórias e, também, a formação de edema no músculo. Visivelmente, notou-se que o tratamento com o LBI foi eficaz em reduzir consideravelmente todos estes efeitos causados pelo VBaJ e VBaA. Todos esses achados morfológicos, confirmaram os nossos resultados demonstrados aqui anteriormente.

Denegri et al. (2016)⁶¹ e Gay et al. (2013)⁶⁶ também realizaram análises histológicas do músculo gastrocnêmio após a injeção do veneno da *B. alternatus* e evidenciaram efeitos similares aos nossos, apresentando principalmente, extensa hemorragia, mionecrose, infiltrado inflamatório e edema. Tanto em nosso estudo como nos do Denegri et al. (2016)⁶¹ e Gay et al. (2013)⁶⁶, a presença de hemorragia intensa causada pelo veneno da *B. alternatus* foi muito evidente, confirmando que esse efeito é provavelmente decorrente da alta quantidade de SVMPs presentes neste veneno. Os resultados encontrados por Barbosa et al. (2009)⁶⁰ também estão de acordo com uma parte dos nossos achados. Eles realizaram análise histológica do músculo gastrocnêmio após a inoculação do veneno da serpente *B. jararacussu* e através dessa análise verificaram o efeito protetor do LBI principalmente sobre a mionecrose causada pela peçonha desta serpente. Neste estudo utilizaram o laser no comprimento de onda de 685 nm, 4,2 J/cm², tempo de irradiação de 29 segundos com 4 aplicações do laser, nos tempos 0,1, 3 e 12 horas após a injeção do veneno. Esses autores observaram que após 24 horas da injeção do veneno, também ocorreu mionecrose, edema, hemorragia, infiltrado inflamatório, além de congestão vascular e, que, o LBI sozinho foi eficaz em reduzir a mionecrose, porém não reduziu a hemorragia, somente quando associado ao antiveneno é que houve uma melhora da hemorragia e essa associação também diminuiu de forma significativa o edema.

5.2 – *IN VITRO*

Neste trabalho também realizamos experimentos *in vitro*, para complementar os nossos achados *in vivo*. Para isso, utilizamos a linhagem de mioblastos C2C12, um modelo de células que já é bem consolidado na literatura para estudo da ação do veneno e/ou toxinas de serpentes, sendo assim, um modelo *in vitro* viável para o nosso estudo.

Nossos resultados demonstraram que tanto o veneno juvenil como o de veneno adulto da *B. alternatus*, na concentração de 50 µg/mL, reduziram de modo similar a viabilidade dos mioblastos C2C12 após incubação de 3 horas, ou seja, houve uma diminuição da atividade mitocondrial destas células. O tratamento feito com a FBM não foi capaz de aumentar essa viabilidade celular de modo significativo. Bustillo et al. (2009)⁶⁷ também analisaram a citotoxicidade do veneno da *B. alternatus* em células C2C12. Esses autores utilizaram diversas concentrações do veneno, variando de 1,25 a 50 µg/mL com tempo de incubação de 3 horas e verificaram que a concentração de 50 µg/mL diminuiu mais de 80% a viabilidade celular e a dose de 5,8 µg/mL foi a concentração de veneno necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular. Esses achados diferem dos nossos resultados, uma vez que a concentração de 50 µg/mL do VBaJ e do VBaA diminuíram em torno de 14,54% e 16,95%, respectivamente, a viabilidade celular.

Em outro estudo, Bustillo et al. (2012)⁶⁸ analisaram a citotoxicidade da baltergin (metaloproteinase) e da Ba SpII RP4 (PLA₂) do veneno de *B. alternatus* em células C2C12. Eles utilizaram diversas concentrações das toxinas, variando de 2 a 700 µg/mL, com tempo de incubação de 3 horas e observaram que a Ba SpII RP4 não causou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, mesmo as mais altas. No entanto, a baltergin já causou um efeito citotóxico a partir de 4 µg/mL e sua concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade celular foi de 583,34 µg/mL. Esses autores também avaliaram o sinergismo entre as duas toxinas, utilizando a concentração de 150 µg/mL, e verificaram que a Ba SpII RP4 sozinha, mais uma vez não causou citotoxicidade e a baltergin sozinha reduziu 40% da viabilidade celular. Porém, quando analisado as duas toxinas

juntas, essas foram capazes de causar 97,5% de descolamento celular, indicando sinergismo entre elas.

Já Mesquita-Ferrari et al. (2009)⁶⁹ verificaram em seu estudo, que a desintegrina ALT-C isolada do veneno da *Bothrops alternatus*, induziu um aumento na viabilidade dos mioblastos, de forma dose-dependente, principalmente nas concentrações de 50 e 100 nM após 48 e 72 horas de incubação.

Com esses achados de Bustillo et al. (2012)⁶⁸ e Mesquita-Ferrari et al. (2009)⁶⁹ pode-se sugerir que em nosso trabalho, a concentração de 50 µg/mL do VBaJ e do VBaA, não foram capazes de causar uma citotoxicidade pronunciada, como foi observado por Bustillo et al. (2009)⁶⁷, pois a desintegrina ALT-C (que pode estar presente em nossos venenos, como foi observado em nosso gel SDS-PAGE e discutido anteriormente) pode ter induzido o aumento na viabilidade dos mioblastos C2C12, impedindo assim, que a baltergin e a Ba SpII RP4 (que também podem estar presentes em nossos venenos) por um efeito sinérgico, causassem uma redução proeminente na viabilidade destes mioblastos.

Silva et al. (2016)⁴² analisaram o efeito da FBM sobre a viabilidade de células C2C12 após estas receberem 0,5 µg/mL do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e ficarem incubadas com este por 15, 30 e 60 minutos. Esses autores utilizaram dois comprimentos de onda do LBI, o vermelho (685nm) e o infravermelho (830 nm), variando a densidade de energia de 2 a 7 J/cm² e verificaram que ambos os comprimentos de onda e todas as densidades de energia testadas causaram um aumento significativo da viabilidade celular, protegendo as células da toxicidade do veneno. O que difere também dos nossos achados, onde a FBM apesar de ter mostrado uma leve tendência em aumentar a viabilidade celular, não causou de fato, um aumento significativo desta. Neste caso, o tratamento com a FBM, talvez não tenha sido eficaz como foi no estudo de Silva et al. (2016)⁴², pois as células, em nosso estudo, receberam uma concentração maior de veneno e ficaram mais tempo incubadas com ele.

A citotoxicidade das células C2C12 também foi analisada por meio da liberação de LDH. Nossos resultados evidenciaram que tanto o VBaJ como o

VBaA induziram a liberação de LDH de forma semelhante, após as células receberem a concentração de 50 µg/mL dos venenos e ficarem incubadas por 3 horas. O tratamento com a FBM, apesar de mostrar uma tendência em diminuir essa liberação do LDH provocada pelos venenos, não conseguiu reduzir de forma significativa a citotoxicidade e, assim, aumentar a viabilidade das células. Esse resultado se mostrou bem semelhante ao observado na miotoxicidade *in vivo*, que foi discutido anteriormente no item 5.1, porém na miotoxicidade *in vivo* a FBM foi capaz de reduzir os níveis de CK.

Bustillo et al. (2012)⁶⁸ também avaliaram a citotoxicidade da baltergin (metaloproteinase) e da Ba SpII RP4 (PLA₂) isoladas do veneno de *B. alternatus* em células C2C12, por meio da liberação da enzima LDH. Esses autores constataram que nenhuma das toxinas sozinhas induziu a liberação de LDH pelas células C2C12, revelando que as células permaneceram viáveis mesmo após 3 horas de incubação com as toxinas em diferentes concentrações. Como Bustillo et al. (2012)⁶⁸ evidenciaram um sinergismo entre essas duas toxinas, pode-se sugerir que elas foram as responsáveis pela liberação de LDH observada em nosso estudo.

Reis et al. (2021)⁴³ apresentaram resultado semelhante ao nosso, ao avaliar o efeito do LED na liberação de LDH induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* em macrófagos murinos. Esses autores observaram que o tratamento com o LED no comprimento de onda de 945 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e tempo de irradiação de 30 segundos, foi capaz de reduzir ligeiramente, mas de forma significativa, a liberação de LDH nos tempos de 24, 48 e 72 horas em que os macrófagos ficaram incubados com o veneno da *B. jararacussu* nas concentrações de 5 e 25 µg/mL, deste modo protegendo os macrófagos da ação citotóxica do veneno. Reis et al. (2021)⁴³ citam em seu estudo, que essa proteção exercida pela FBM contra o efeito citotóxico do veneno possa ser devido ao fato de que a FBM quando utilizada para tratar as células, provoca um aumento nos níveis de ATP e isso poderia desencadear uma cascata de sinalização que gera a citoproteção celular contra a ação do veneno. Essa possibilidade também foi verificada por Silva et al. (2016)⁴², que mostraram que a terapia de fotobiomodulação com o LBI elevou os níveis de ATP intracelular em células C2C12 incubadas também com o veneno da *B.*

jararacussu. O que leva a acreditar que em nosso estudo, a FBM agiu da mesma forma contra a ação citotóxica do VBaJ e VBaA.

A miogênese, formação do músculo esquelético, é um processo complexo que envolve diversas etapas como a proliferação e a diferenciação de mioblastos em miotubos multinucleados que se desenvolvem em fibras musculares contráteis. Esse processo de diferenciação é controlado por fatores reguladores de transcrição específicos do músculo (MRFs) que envolve o antígeno de diferenciação miogênica (MyoD), a miogenina, o fator miogênico 5 (Myf5) e o fator regulador miogênico 4 (MRF4)⁷⁰. Quando o músculo esquelético é lesionado, ele tem a capacidade de iniciar um processo de reparo semelhante a miogênese e a FBM pode contribuir neste processo estimulando a proliferação e a diferenciação⁷¹. Portanto, avaliamos o efeito da FBM na diferenciação das células C2C12 após estas ficarem incubadas por 3 horas com o VBaJ e VBaA na concentração de 50 µg/mL. Nossos resultados mostraram que os dois venenos agiram de modo similar no qual induziram morte celular e, das células que sobreviveram, poucas conseguiram se diferenciar. Porém, o tratamento com a FBM, conseguiu proteger as células, reduzindo a morte celular e promovendo a diferenciação de modo parecido com as dos grupos controle e controle irradiado com FBM. Nossos achados estão de acordo com os de Silva et al. (2016)⁴², que também observaram que a FBM foi eficaz em promover diferenciação das células C2C12 após estas serem incubadas com o veneno da *B. jararacussu*. Silva et al. (2016)⁴² também evidenciaram em seu estudo, que a FBM foi capaz de aumentar a expressão de MyoD e miogenina, e essa modulação pode ter colaborado na proteção das células e na regeneração das fibras musculares. Desta forma, é possível que em nosso trabalho, a FBM agiu da mesma forma modulando esses fatores miogênicos (MyoD e miogenina).

As mitocôndrias tem um papel importante no funcionamento celular, pois são elas as responsáveis pela produção de energia nas células. Sabe-se que uma das ações da FBM é sobre as mitocôndrias, onde ela aumenta o metabolismo mitocondrial e a síntese de ATP o que pode levar a uma melhora no desempenho muscular⁷². Ao analisar o efeito da FBM no potencial de membrana mitocondrial (MMP) dos mioblastos após ação do VBaJ e VBaA, os nossos resultados revelaram que não houve diferença na média de intensidade

de fluorescência entre os grupos, ou seja, não houve um aumento na síntese de potencial de membrana nas células, inclusive nos grupos que foram tratados com a FBM. Ferraresi et al. (2015)⁷² demonstraram em seu estudo que a terapia de FBM usando o LED provocou um aumento na síntese de potencial de membrana e de ATP em células C2C12 e que houve uma correlação entre eles medido durante o tempo de 5 min (efeito imediato) e 24 horas (efeito prolongado). Esses autores observaram que as células musculares aumentaram a síntese de MMP e ATP nos tempos de 3 e 6 horas, após receberem o tratamento com a FBM, sendo que o pico dos dois foi às 6 horas, o que diverge dos nossos resultados. Em nosso trabalho, o VBaJ e o VBaA podem ter retardado a síntese de MMP e, por isso, não houve nenhuma alteração no tempo de 3 horas. Talvez se também tivéssemos feito uma avaliação após 6 horas como Ferraresi et al. (2015)⁷², poderíamos ter encontrado um resultado semelhante. Ou também pode ser devido ao fato de que os dois venenos (VBaJ e VBaA) provocaram o descolamento das células, após as 3 horas de incubação na concentração de 50 µg/mL, a maioria delas poderiam não estar mais viáveis e por isso não houve o aumento da síntese de MMP. Esse descolamento celular observado provavelmente foi ocasionado pelas metaloproteinase baltergin e a PLA₂ Ba SpII RP4, presentes no veneno da *B. alternatus* e que agem de forma sinérgica, como já mencionado anteriormente⁶⁸. Essa hipótese deverá ser avaliada em estudos futuros.

Sabe-se que o músculo esquelético tem a capacidade de regeneração após um dano muscular, e essa capacidade regenerativa depende de células satélites. Essas células se proliferam como mioblastos e a fusão destes mioblastos forma os miotubos multinucleados que são integrados aos segmentos danificados do tecido muscular esquelético⁷³. Os venenos botrópicos são miotóxicos, ou seja, acabam interferindo nessa regeneração muscular, sendo que esse processo é muito importante para que o músculo se reestabeleça. Uma vez que a proliferação celular faz parte de um dos processos da regeneração muscular, analisamos o efeito da FBM sobre a proliferação celular, após a ação dos VBaJ e VBaA em células musculares C2C12. Curiosamente, nossos resultados demonstraram que as células que receberam os dois venenos apresentaram atividade mitogênica parecida com a do grupo

controle positivo, e que o controle negativo não teve atividade mitogênica, algo que não esperávamos. Já o tratamento com a FBM conseguiu intensificar levemente essa atividade mitogênica em todos os grupos, inclusive no grupo controle negativo.

Cominetti et al. (2004)⁷⁴ mostraram em seu estudo que a ALT-C isolada do veneno de *B. alternatus*, promoveu a proliferação de células endoteliais e regulou positivamente a expressão de diversos genes relacionados a proliferação celular. Como exposto anteriormente, Mesquita-Ferrari et al. (2009)⁶⁹ também observaram em seu estudo que a ALT-C teve um papel positivo, aumentando a viabilidade de mioblastos. À vista disso, pode-se deduzir que essa atividade mitogênica apresentada nos grupos VBaJ e VBaA do nosso estudo, pode ter sido em decorrência da ação da ALT-C presente nos venenos. Também já foi supracitado que Silva et al. (2016)⁴² mostraram evidências de que a FBM aumentou a expressão de MyoD e miogenina, e estes são marcadores de crescimento muscular pois podem regular a divisão das células satélites. Sendo assim o aumento da proliferação celular promovido pela FBM em nosso estudo, provavelmente foi devido a sua ação sobre estes fatores.

A apoptose é um processo pelo qual a célula passa para garantir a homeostase das populações de células nos tecidos e para que estas se mantenham saudáveis, esse processo resulta na morte controlada da célula, mais conhecida como “morte celular programada”. A apoptose pode ser iniciada pela própria célula quando ela detecta algum dano ou pode ser como uma defesa em reações imunes e quando são afetadas por agentes nocivos ou doenças. Já a necrose é uma forma alternativa de morte celular não controlada, causada por alguma lesão externa que promove a lise da membrana, com extravasamento de conteúdo celular e, por consequência, leva à uma inflamação⁷⁵. Nossos resultados evidenciaram que o VBaJ induziu apoptose das células C2C12, após incubação de 3 horas com 50 µg/mL e, ele induziu uma maior porcentagem de apoptose quando comparado ao VBaA. Já em relação à necrose, nenhum dos dois venenos induziram necrose significativa nas células quando comparados aos grupos controle. O tratamento com a FBM conseguiu reduzir significativamente somente as células apoptóticas e necróticas ocasionadas pelo VBaA. Bustillo et al. (2009)⁶⁷ também investigaram a apoptose induzida pelo

veneno da *Bothrops alternatus* nas células C2C12 após estas ficarem incubadas com o veneno por 30 minutos com uma concentração de 10 µg/mL. Por meio de ensaio de imunofluorescência, esses autores verificaram que as células apresentavam algumas características de células apoptóticas, como condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento celular e formação de bolhas na superfície das células. Bustillo et al. (2017)⁷⁶ mostraram que a metaloproteinase baltergin, uma toxina isolada do veneno da *B. alternatus*, tem um papel importante da indução da apoptose em células C2C12, sendo que um dos mecanismos pelo qual essa toxina leva as células a apoptose é por meio da inibição da adesão celular. Já Ribeiro et al. (2016)⁷⁷ revelaram em seu estudo, que a BaltLAAO – I, uma LAAO isolada do veneno da *B. alternatus*, também é responsável por induzir apoptose nas células. Esses autores utilizaram diferentes concentrações da BaltLAAO – I e diferentes tempos em uma linhagem de células T tumorais humanas (JURKAT) e observaram que a BaltLAAO – I foi citotóxica para estas células e induziu a apoptose, porém este efeito dependeu da concentração e tempo utilizados. Ainda, verificaram que a BaltLAAO – I induziu a produção de ROS nas células JURKAT, ou seja, ROS foram relevantes na citotoxicidade causada pela BaltLAAO – I em células tumorais. Ribeiro et al. (2016)⁷⁷ também relataram que essa atividade citotóxica induzida pela BaltLAAO – I foi específica contra células tumorais, mas não contra células normais, como as células mononucleares do sangue periférico humano. Sendo assim, seriam necessários mais estudos com a BaltLAAO – I utilizando outros tipos celulares, como a C2C12, para saber se essa toxina também seria citotóxica e induziria a apoptose em células musculares. Caso essa citotoxicidade contra a C2C12 também fosse comprovada, explicaria mais um mecanismo pelo qual o veneno de *B. alternatus* induz a apoptose em células C2C12.

Gouveia et al. (2020)⁷⁸ avaliaram o efeito da FBM sobre a apoptose e necrose de células C2C12, induzidas pelos venenos da *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. jararacussu*. Eles também utilizaram a concentração de 50 µg/mL de cada veneno nas células C2C12, com tempo de incubação de 2 horas e para o tratamento com a FBM os parâmetros do LBI utilizados por eles, foram semelhantes aos nossos. Os autores constataram que a FBM conseguiu reduzir significativamente a apoptose e/ou necrose causadas pelos três venenos,

corroborando os nossos achados. Essa evidência, mostra que a FBM consegue modular a morte celular após a ação dos venenos e de suas toxinas. Uma hipótese que Gouveia et al. (2020)⁷⁸ citam em seu estudo, é de que a FBM pode modular essa morte celular, através da diminuição da produção de ROS, que como já citado acima, os ROS têm um papel importante na citotoxicidade das células. Essa hipótese pode ser afirmada pelo estudo de Reis et al. (2021)⁴³ que comprovaram que o tratamento com a FBM, utilizando o LED, diminuiu significativamente a produção de ROS por macrófagos murinos após ação do veneno da *B. jararacussu*. Desta forma, a FBM em nosso estudo, deve ter modulado a apoptose celular, pelo mesmo mecanismo.

A maioria destes estudos não mencionaram se utilizaram venenos de espécimes adultas ou juvenis das serpentes botrópicas e nenhum deles fez uma análise comparativa dos dois venenos, o que dificultou uma melhor analogia com os nossos resultados.

5.3 – Veneno da *Bothrops alternatus* juvenil Vs. adulto

Ao analisar os efeitos locais causados pelos venenos juvenil e adulto da serpente *B. alternatus* e fazer uma comparação destes dois venenos, para verificar possíveis diferenças entre eles, foi observado *in vivo*, que em relação a formação de edema o veneno juvenil causou um edema mais proeminente em comparação ao veneno adulto. Na avaliação da migração celular, observou-se que o veneno juvenil induziu uma migração do número de leucócitos totais levemente maior que o veneno adulto para a cavidade peritoneal, como também induziu uma maior migração de leucócitos mononucleares. No entanto, o veneno adulto induziu uma migração de polimorfonucleares ligeiramente maior em relação ao veneno juvenil. A respeito da atividade do CK, ambos os venenos causaram miotoxicidade em proporções similares, não havendo diferença estatística entre eles. Por fim, o veneno juvenil causou uma maior hiperalgesia em comparação ao veneno adulto da *B. alternatus* somente na primeira hora avaliada e nas demais horas (3, 6 e 24) não houve diferenças entre eles quanto a hiperalgesia.

Furtado et al. (1991)²² estudaram nove espécies do gênero *Bothrops* comparando o veneno das serpentes adultas com o veneno de sua prole, e uma

das espécies estudadas foi a *B. alternatus*. Em geral, eles observaram diferenças significativas entre os venenos das serpentes adultas (mães) e dos recém-nascidos (filhos) em todas as espécies analisadas. Em relação a *B. alternatus*, verificaram que os recém-nascidos apresentaram maior toxicidade letal, maior atividade amidolítica, menor atividade caseinolítica, maior atividade fibrinolítica, maior atividade coagulante plasmática e maior ativação do fator X e da protrombina, quando comparados com o veneno da serpente adulta (mãe). Já o veneno da mãe não apresentou atividade amidolítica e nem atividade de protrombina.

Saldarriaga et al. (2003)²⁵ também observaram que espécimes juvenis de *B. asper* e de *B. atrox* apresentaram maior atividade letal, hemorrágica, coagulante e formadora de edema em comparação aos espécimes adultos. Por sua vez, os espécimes adultos manifestaram uma maior atividade de PLA₂.

Hatakeyama et al. (2021)²⁴ estudaram o veneno das serpentes *B. moojeni* (machos e fêmeas) nascidas em cativeiro em diferentes estágios da vida em ambiente controlado. Esses autores verificaram que os venenos dos neonatos e dos juvenis apresentaram alta atividade pró coagulante e baixa atividade colagenolítica, enquanto nos adultos foi o oposto. Observaram, ainda, que o veneno dos neonatos parecia matar mais lentamente os camundongos, mostrando a preferência por presa e que a dieta que a serpente segue pode interferir na ação do seu veneno. Também relataram que houve diferenças entre os venenos de machos e fêmeas.

Ao comparar esses achados de Furtado et al. (1991)²², Saldarriaga et al. (2003)²⁵ e Hatakeyama et al. (2021)²⁴ *in vivo*, com o nosso estudo, os resultados do presente estudo demonstraram que o VBaJ, de modo geral, exerceu uma maior atividade local em comparação ao VBaA, corroborando, em parte, os resultados destes autores.

Nos resultados *in vitro* foi observado que os dois venenos causaram uma diminuição da viabilidade celular e um aumento da liberação de LDH das células C2C12 de forma bem similar quanto a diferenciação, o potencial de membrana e descolamento celular, mais uma vez os venenos agiram de modo semelhante. Já em relação a proliferação celular, o veneno adulto conseguiu induzir uma

proliferação levemente maior que o veneno juvenil e por fim, o veneno juvenil conseguiu provocar uma maior apoptose em comparação ao do veneno adulto.

Não foi encontrado na literatura trabalhos que também tenham estudado as diferenças entre o veneno juvenil e o veneno adulto de serpentes botrópicas *in vitro*, o que dificultou para fazer uma melhor analogia com os nossos achados e ter um aprofundamento mais satisfatório na discussão deles.

Com relação as diferenças que foram encontradas na composição dos venenos em nosso gel de SDS-PAGE, nossos achados estão de acordo com a literatura. da Silva Aguiar et al. (2020)⁷⁹ analisaram os perfis proteicos dos venenos juvenil e adulto da serpente *B. jararacussu* e também verificaram que a banda proteica que correspondia a PLA₂ (13 kDa) era mais evidente no veneno adulto. Já as bandas proteicas que se encontravam nas regiões entre 50-37 kDa, que são as regiões das famílias de proteases, era um pouco mais evidente nos venenos juvenis. Hatakeyama et al. (2021)²⁴ também obtiveram perfis proteicos dos venenos juvenil e adulto da *B. moojeni* similares ao da Silva Aguiar et al. (2020)⁷⁹ e ao nosso. Com essas evidências, fica claro que a maioria dos venenos botrópicos são compostos principalmente pelas proteases e PLA₂, que existe uma mudança na quantidade dessas toxinas no veneno das serpentes conforme elas crescem e se tornam adultas, e que estas toxinas são responsáveis pelas principais reações locais que se desenvolvem após a picada das serpentes.

Segundo Furtado et al. (1991)²², essas variações apresentadas nos venenos de serpentes recém-nascidas e adultas do gênero *Bothrops*, podem ser explicadas pelo fato de as serpentes jovens terem que compensar a sua baixa produção de veneno com o aumento da toxicidade do mesmo, ou também, devido ao fato de terem que se adaptar para matar e digerir diferentes tipos de presas, ou pode ser também devido a mudança na dieta alimentar. Esta última teoria, é uma das mais sustentadas por diversos autores, como a responsável por estas alterações na composição do veneno. Como por exemplo, de acordo com Augusto-de-Oliveira et al. (2016)²³ as serpentes *B. jararaca* quando recém-nascidas se alimentam de pequenas presas ectotérmicas, como lagartos, anfíbios e artrópodes e já as adultas se alimentam principalmente de mamíferos. Contudo, Rocha e Furtado (2005)⁵⁰ citam em seu artigo, que as serpentes *B.*

alternatus são especialistas em mamíferos durante todas as fases de suas vidas, mostrando que a teoria da dieta alimentar não se aplica à essa espécie.

E surge o questionamento: qual será o fator que influencia essas alterações no veneno da *B. alternatus*? Dentre as teorias apresentadas acima, a primeira é a que melhor se enquadra, de que as serpentes jovens podem compensar a baixa produção de veneno pelo aumento da sua toxicidade.

Diante de tudo que foi evidenciado neste trabalho, são necessários mais estudos sobre a *B. alternatus*, principalmente com o veneno juvenil, uma vez que foram encontrados na literatura muito mais estudos que utilizaram o veneno adulto. Também se faz necessário estudos *in vitro* comparando os dois venenos, pois não foram encontrados artigos nesse modelo. O aprofundamento do estudo sobre o veneno da *B. alternatus*, é de fundamental importância para uma melhor compreensão das diferenças entre os venenos juvenis e adultos desta espécie, e o porquê destas alterações, como também, para melhor compreender os efeitos que o veneno desta serpente causa sobre as vítimas, principalmente em relação aos efeitos locais. Ademais, é fundamental e de extrema importância, mais estudos utilizando a FBM e o veneno desta espécie, para melhor elucidar a eficácia da FBM sobre os efeitos locais causados por estas serpentes. Uma vez que, na literatura, também não há estudos que avaliaram a ação da FBM sobre os efeitos locais causados pelo veneno da *B. alternatus*, há somente estudos que utilizaram os venenos de outras espécies do gênero *Bothrops*.

6. CONCLUSÃO

Conforme os resultados encontrados *in vivo* e *in vitro* causados pelos venenos juvenil e adulto da serpente *Bothrops alternatus*, pode-se concluir que, embora ambos os venenos (juvenil e adulto) tenham provocado reações locais, existe diferença na magnitude de alguns desses efeitos, que precisam ser melhor investigados e elucidados. O tratamento com a FBM se mostrou benéfico em reduzir essas reações locais induzidas pelos venenos desta serpente e também revelou ser uma excelente terapia coadjuvante à soroterapia no envenenamento botrópico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Snakebites – disease*. Disponível em: <<http://www.who.int/snakebites/disease/en/>>. Acesso em 24/03/2020.
- 2 – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Recommendation for the Adoption of an Additional Disease as a Neglected Tropical Disease – The Case for Snakebite Envenoming*. Disponível em: <https://www.who.int/snakebites/news/Recommendation_for_snakebite_envenoming_for_adoption_of_additional_NTD.pdf?ua=1>. Acesso em 24/03/2020.
- 3 – ALBUQUERQUE PLMM, DA SILVA JUNIOR GB, MENESES GC, MARTINS AMC, LIMA DB, RAUBENHEIMER J, FATHIMA S, BUCKLEY N, DAHER EF. *Acute Kidney Injury Induced by Bothrops Venom: Insights into the Pathogenic Mechanisms*. *Toxins* (Basel). 2019 Mar 5;11(3):148. Doi: 10.3390/toxins11030148.
- 4 – MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos*. Fundação Nacional de Saúde; 2001; 2ª Ed. Brasília, Brasil.
- 5 – MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Situação epidemiológica – Dados*. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em 09/04/2020.
- 6 – SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. *Acidente por animais peçonhentos*. Disponível em: <<https://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>> Acesso em 19/11/2021.
- 7 – PINHO FMO, PEREIRA ID. *Ofidismo*. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 47 (1). Mar 2001. Doi: 10.1590/S0104-42302001000100026.
- 8 – CARNEIRO AS, RIBEIRO OG, DE FRANCO M, CABRERA WH, VORRARO F, SIQUEIRA M, IBAÑEZ OM, STAROBINAS N. *Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response*. *Toxicon*. 2002 Nov;40(11):1571-9. Doi: 10.1016/s0041-0101(02)00174-5.
- 9 – DOS SANTOS MC, MARTINS M, BOECHAT AL, DE SÁ-NETO RP, DE OLIVEIRA ME. *Serpentes de interesse médico da Amazônia: Biologia, venenos e tratamento de acidentes*. Manaus: UA/SESU, 1995. 70 p.: il. (color.)
- 10 – RIBEIRO LA, JORGE MT. *Acidente por serpentes do gênero Bothrops: série de 3.139 casos*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997 Nov-Dec;30(6):475-80. Portuguese. Doi: 10.1590/s0037-86821997000600006.
- 11 – MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia de vigilância epidemiológica*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2009; 7ª Ed. Brasília, Brasil.

- 12 – OHLER M, GEORGIEVA D, SEIFERT J, BERGEN MV, ARNI RK, GENOV N, BETZEL C. *The venomics of Bothrops alternatus is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities*. J Proteome Res. 2010 May 7;9(5):2422-37. Doi: 10.1021/pr901128x.
- 13 – BECKER FG, RAMOS RA, MOURA LA. *Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul*. Ministério do Meio Ambiente e Fund. Zoobotânica do Rio Grande do Sul; 2007; Brasília, Brasil.
- 14 – GIRAUDO AR, ARZAMENDIA V, LOPEZ SM, QUAINI RO, PRIETO Y, LEIVA LA, REGNER SA, URBAN JM. *Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo*. Revista FABICIB, vol. 12, págs. 69 a 89, 2008.
- 15 – SARQUIS JA, CRISTALDI MA, ARZAMENDIA V, BELLINI G, GIRAUDO AR. *Species distribution models and empirical test: Comparing predictions with well-understood geographical distribution of Bothrops alternatus in Argentina*. Ecol Evol. 2018 Oct 2;8(21):10497-10509. Doi: 10.1002/ece3.4517.
- 16 – SOERENSEN B. *Acidentes por Animais Peçonhentos: Reconhecimento, Clínica e Tratamento*. São Paulo: Atheneu, 2000.
- 17 – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Snakebite information and Data Platform*. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform>> Acesso em: 20/11/2021.
- 18 – COSTA JO, PETRI CB, HAMAGUCHI A, HOMSI-BRANDEBURGO MI, OLIVEIRA CZ, SOARES AM, OLIVEIRA F. *Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from Bothrops alternatus venom*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. V.13, n.3, p.640-654, 2007.
- 19 – SETUBAL SS, PONTES AS, FURTADO JL, KAYANO AM, STÁBELI RG, ZULIANI JP. *Effect of Bothrops alternatus snake venom on macrophage phagocytosis and superoxide production: participation of protein kinase C*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 17 (4). 2011. Doi:10.1590/S1678-91992011000400010.
- 20 – CARDOSO KC, DA SILVA MJ, COSTA GG, TORRES TT, DEL BEM LE, VIDAL RO, MENOSSI M, HYSLOP S. *A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake Bothrops alternatus (uruçu)*. BMC Genomics. 2010 Oct 26;11:605. Doi: 10.1186/1471-2164-11-605.
- 21 – ZELANIS A, VENTURA JS, CHUDZINSKI-TAVASSI AM, FURTADO MFD. *Variability in expression of Bothrops insularis snake venom proteases: An ontogenetic approach*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 145 (2007) 601–609. Doi: 10.1016 / j.cbpc.2007.02.009.
- 22 – FURTADO MFD, MARUYAMA M, KAMIGUTI AS, ANTONIO LC. *Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and*

their offspring. *Toxicon*. 1991; 29 (2): 219-26. Doi: 10.1016 / 0041-0101 (91) 90106-2.

23 – AUGUSTO-DE-OLIVEIRA C, STUGINSKI DR, KITANO ES, ANDRADE-SILVA D, LIBERATO T, FUKUSHIMA I, SERRANO SMT, ZELANIS A. *Dynamic Rearrangement in Snake Venom Gland Proteome: Insights into Bothrops jararaca Intraspecific Venom Variation*. *Journal of Proteome Research*. 2016 15 (10), 3752-3762. Doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00561.

24 – HATAKEYAMA DM, TASIMA LJ, DA COSTA GALIZIO N, SERINO-SILVA C, RODRIGUES CFB, STUGINSKI DR, SANT'ANNA SS, GREGO KF, TASHIMA AK, NISHIDUKA ES, DE MORAIS-ZANI K, TANAKA-AZEVEDO AM. *From birth to adulthood: An analysis of the Brazilian lancehead (Bothrops moojeni) venom at different life stages*. *PLoS One*. 2021 Jun 10;16(6):e0253050. Doi: 10.1371/journal.pone.0253050.

25 – SALDARRIAGA MM, OTERO R, NÚÑEZ V, TORO MF, DÍAZ A, GUTIÉRREZ JM. *Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia*. *Toxicon*. 2003 Sep 15;42(4):405-11. Doi: 10.1016/s0041-0101(03)00171-5.

26 – ZELANIS A, TASHIMA AK, ROCHA MM, FURTADO MF, CAMARGO AC, HO PL, SERRANO SM. *Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey*. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2278-91. Doi: 10.1021/pr901027r.

27 – FURTADO MFD. *Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de venenos em serpentes peçonhentas brasileiras*. *Herpetologia no Brasil*. 2005.

28 – GUTIÉRREZ JM, CALVETE JJ, HABIB AG, HARRISON RA, WILLIAMS DJ, WARRELL DA. *Snakebite envenoming*. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17063 (2017). Doi: 10.1038/nrdp.2017.63.

29 – MAMEDE CCN, SOUSA BBS, PEREIRA DFC, MATIAS MS, QUEIROZ MR, MORAIS NCG, VIEIRA SAPB, STANZIOLA L, OLIVEIRA F. *Comparative analysis of local effects caused by Bothrops alternatus and Bothrops moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations*. *TOXICON*. 2016, 117:37-45. Doi: 10.1016 / j.toxicon.2016.03.006.

30 – CAMEY KU, VELARDE DT, SANCHEZ EF. *Characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil*. *TOXICON*. 40(5): 501-9, 2002. Doi: 10.1016 / s0041-0101 (01) 00245-8.

31 – LINS RDAU, DANTAS, EM, LUCENA KCR, CATÃO MHCV, GRANVILLE-GARCIA AF, NETO LGD. *Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo*. *An. Bras. Dermatol*. 2010; 85(6): 849-855.

32 – RIBEIRO M, ZECELL DM. *Laser de baixa intensidade*. In: *Gutknecht N, Eduardo CP (eds) A Odontologia e o Laser: Atualização do laser na especialidade odontológica*. 1st edn. Quintessence, São Paulo, 2004, pp 217–240.

- 33 – FREITAS LF, HAMBLIN MR. *Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy*. IEEE J Sel Top Quantum Electron. (2016) 22(3). Doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201.
- 34 – DOMPE C, MONCRIEFF L, MATYS J, GRZECH-LE'SNIAK K, KOCHEROVA L, BRYJA A, BRUSKA M, DOMINIAK M, et al. *Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications*. J. Clin. Med. (2020) 9, 1724; Doi:10.3390/jcm9061724.
- 35 – AVCI P, GUPTA A, SADASIVAM M, VECCHIO D, PAM Z, PAM N, HAMBLIN MR. *Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring*. Semin Cutan Med Surg. (2013) 32(1): 41–52.
- 36 – GOMES CF, SCHAPOCHNIK A. *O uso terapêutico do Laser de Baixa Intensidade (LBI) em algumas patologias e sua relação com a atuação na Fonoaudiologia*. Distúrb Comun, São Paulo, 29(3): 570-578, (2017). DOI: 10.23925/2176-2724.2017v29i3p570-578.
- 37 – CAMPANA V, MOYA M, GAVOTTO A, JURI H, PALMA JA. *Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes*. J Clin Laser Med Surg. 1998 Dec;16(6):317-20. Doi: 10.1089/clm.1998.16.317.
- 38 – DOURADO DM, FAVERO S, BARANAUSKAS V, CRUZ-HOFLING MA. *Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops moojeni snake venom*. Lasers Surg Med. 2003;33(5):352-7. Doi: 10.1002/lsm.10237.
- 39 – NADUR-ANDRADE N, BARBOSA AB, CARLOS FP, LIMA CJ, COGO JC, ZAMUNER SR. *Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom*. Lasers Med Sci. 2012 Jan;27(1):65-70. Doi: 10.1007/s10103-011-0914-1.
- 40 – BARBOSA AM, VILLAVERDE AB, GUIMARÃES-SOUZA L, RIBEIRO W, COGO JC, ZAMUNER SR. *Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops jararacussu snake venom*. Toxicon. 2008 Jun 1;51(7):1236-44. Doi: 10.1016/j.toxicon.2008.02.007.
- 41 – GUIMARÃES-SOUZA L, DALE CS, NADUR-ANDRADE N, BARBOSA AM, COGO JC, ZAMUNER SR. *Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by Bothrops jararacussu snake venom*. Clin Exp Med Lett; 2011 52 (3-4): 97- 102.
- 42 – SILVA LM, SILVA CA, SILVA AD, VIEIRA RP, MESQUITA-FERRARI RA, COGO JC, ZAMUNER SR. *Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom*. PLoS One. 2016 Apr 8;11(4):e0152890. Doi: 10.1371/journal.pone.0152890.
- 43 – REIS VP, REGO CMA, SETÚBAL SS, TAVARES MNM, BOENO CN, FERREIRA AAF, PALOSCHI MV, SOARES AM, ZAMUNER SR, ZULIANI JP. *Effect of light emitting diode photobiomodulation on murine macrophage function after Bothrops envenomation*. Chem Biol Interactv 2021 Jan 5;333:109347. Doi: 10.1016/j.cbi.2020.109347.

44 – LAEMMLI UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 1970, 227, 680– 685. Doi: 10.1038/227680a0.

45 – CORRÊA AL, OLIVEIRA AP, RUPPELT BM, ARAÚJO ERA, SANTOS MG, CALDAS GR, MUYLAERT FF, AMENDOEIRA FC, FERRARIS FK, SOUZA CMV, FULY AL, ROCHA L. *Protective effect of *Myrsine parvifolia* plant extract against the inflammatory process induced by *Bothrops jararaca* snake venom*. *Toxicon*. 2019 Jan;157:66-76. Doi: 10.1016/j.toxicon.2018.11.289.

46 – SANTOS BARRETO GNL, OLIVEIRA SS, ANJOS IV, CHALKIDIS HM, MOURÃO RHV, MOURA-DA-SILVA AM, SANO-MARTINS IS, GONÇALVES LRC. *Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. (2017) 11(3): e0005458. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005458.

47 – PRADO ND, PEREIRA SS, DA SILVA MP, MORAIS MSS, KAYANO AM, MOREIRA-DILL LS, LUIZ MB, ZANCHI FB, FULY AL, HUACCA ME, FERNANDES CF, CALDERON LA, ZULIANI JP, DA SILVA LHP, SOARES AM, STABELI RG, FERNANDES CF. *Inhibition of the Myotoxicity Induced by *Bothrops jararacussu* Venom and Isolated Phospholipases A2 by Specific Camelid Single-Domain Antibody Fragments*. *PLoS One*. 2016 Mar 30;11(3):e0151363. Doi: 10.1371/journal.pone.0151363.

48 – SILVA LMG, ZAMUNER LF, DAVID AC, SANTOS AS, CARVALHO PTC, ZAMUNER SR. *Photobiomodulation therapy on bothrops snake venom-induced local pathological effects: A systematic review*. *Toxicon*. 2018 Sep 15;152:23-29. Doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.006.

49 – ZELANIS A, ANDRADE-SILVA D, ROCHA MM, FURTADO MF, SERRANO SM, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IL, HO PL. *A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1554. Doi: 10.1371/journal.pntd.0001554.

50 – ROCHA MMT, FURTADO MFD. *Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae)*. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22 (2005), pp. 383 – 393. Doi:10.1590/S0101-81752005000200012.

51 – LANARI LC, ROSSET S, GONZÁLEZ ME, LIRIA N, DE ROODT AR. *A study on the venom of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron and Duméril, from different regions of Argentina*. *Toxicon*. 2010 Jul;55(8):1415-24. Doi: 10.1016/j.toxicon.2010.01.015.

52 – VITORINO-CARDOSO AF, RAMOS OHP, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. *Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2006 Jul;144(3):334-42. Doi: 10.1016/j.cbpb.2006.03.010.

53 – MAMEDE CCN, SIMAMOTO BBS, PEREIRA DFC, COSTA JO, RIBEIRO MSM, OLIVEIRA F. *Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian*

bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon* 187 (2020) 10–18. Doi: 10.1016/j.toxicon.2020.08.016.

54 – ECHEVERRÍA S, LEIGUEZ E, GUIJAS C, NASCIMENTO NG, ACOSTA O, TEIXEIRA C, LEIVA LC, RODRÍGUEZ JP. *Evaluation of proinflammatory events induced by Bothrops alternatus snake venom*. *ChemicoBiological Interactions* 281 (2018) 24–31. Doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.022.

55 – GERMOLEC DR, SHIPKOWSKI KA, FRAWLEY RP, EVANS E. *Markers of Inflammation*. Em: DeWitt J., Rockwell C., Bowman C. (eds) *Immunotoxicity Testing. Methods in Molecular Biology*, (2018) vol 1803. Humana Press, New York, NY. Doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_5.

56 – SAFAVI SM, KAZEMI B, ESMAEILI M, FALLAH A, MODARRESI A, MIR M. *Effects of low-level He–Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , Bfgf, and PDGF in rat's gingiva*. *Lasers Med Sci*. 23, 331–335 (2008). Doi: 10.1007/s10103-007-0491-5

57 – OLIVO RA, TEIXEIRA CFP, WALLACE JL, GUTIÉRREZ JM, ZAMUNER SR. *Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms*. *Toxicon* 49 (2007) 670–677. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.006.

58 – MOREIRA V, ZAMUNER SR, WALLACE JL, TEIXEIRA CPF. *Bothrops jararaca and Crotalus durissus terrificus venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases*. *Toxicon*. Abril de 2007; 49 (5): 615-24. Doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.006.

59 – 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 Dec 15;76:1-10. Doi: 10.1016/j.toxicon.2013.08.063

60 – BARBOSA AM, VILLAVERDE AB, SOUSA LG, MUNIN E, FERNANDEZ CM, COGO JC, ZAMUNER SR. *Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom*. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27 (4): 591-7. Doi: 10.1089 / pho.2008.2296.

61 – DENEGRI MEG, TEIBLER GP, MARUÑAK SL, HERNÁNDEZ DR, ACOSTA OC, LEIVA LC. *Efficient muscle regeneration after highly haemorrhagic Bothrops alternatus venom injection*. *Toxicon*. 2016 Nov;122:167175. Doi: 10.1016/j.toxicon.2016.10.005.

62 – LAURIA PSS, MAIA-MARQUES R, OLIVEIRA R, NUNES VLC, CASAS-SILVA LL. *Effects of photobiomodulation therapy on the local experimental envenoming by Bothrops leucurus snake*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biolog*. Available online 22 November 2020, 112087. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112087.

63 – DOIN-SILVA R, BARANAUSKAS V, RODRIGUES-SIMIONI L, CRUZHÖFLING MA. *The Ability of Low Level Laser Therapy to Prevent Muscle*

Tissue Damage Induced by Snake Venom. Photochemistry and Photobiology, 2009, 85: 63–69. Doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00397.x.

64 – MALANGE KF, SANTOS GG, KATO NN, TOFFOLI-KADRI MC, CAROLLO CA, SILVA DB, PORTUGAL LC, ALVES FM, RITA PHS, PARADA CA, RONDON ES. *Tabebuia aurea* decreases hyperalgesia and neuronal injury induced by snake venom. J Ethnopharmacol. 2019 Apr;233:131140. Doi: 10.1016/j.jep.2018.12.037.

65 – NADUR-ANDRADE N, DALE CS, OLIVEIRA VR, TONIOLO EF, FELICIANO RD, SILVA JAJR, ZAMUNER SR. *Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation*. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Oct 17;10(10):e0004998. Doi: 10.1371/journal.pntd.0004998.

66 – GAY C, MARUÑAK S, TEIBLER P, LEIVA L, ACOSTA O. *Effect of monospecific antibodies against baltergin in myotoxicity induced by Bothrops alternatus venom from northeast of Argentina. Role of metalloproteinases in muscle damage*. Toxicon. (2013) Mar 1;63:104-11. Doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.028.

67 – BUSTILLO S, LUCERO H, LEIVA LC, ACOSTA O, JOFFÉ EBK, GORODNER JO. *Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by Bothrops venoms from the northeast of Argentina*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 15 (1) • 2009 • Doi: 10.1590/S1678-91992009000100004.

68 – BUSTILLO S, GAY CC, DENEGRI MEG, PONCE-SOTO LA, JOFFÉ EBK, ACOSTA O, LEIVA LC. *Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from Bothrops alternatus venom on skeletal muscle (C2C12) cells*. Toxicon. 2012 Feb;59(2):338-43. Doi: 10.1016/j.toxicon.2011.11.007.

69 – MESQUITA-FERRARI RA, DE MORAES CK, MICOCCI KC, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. *ALT-C, a disintegrin-like Cys-rich protein from Bothrops alternatus, increases skeletal myoblast viability*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 15 (2) • 2009. Doi: 10.1590 / S1678-91992009000200013.

70 – GE G, YANG D, TAN Y, CHEN Y, JIANG D, JIANG A, LI Q, LIU Y, ZHONG Z, LI X, ZHANG S, ZHU L. *miR-10b-5p Regulates C2C12 Myoblasts Proliferation and Differentiation*. Biosci Biotechnol Biochem. 2019 Feb;83(2):291-299. Doi: 10.1080/09168451.2018.1533805.

71 – ARTILHEIRO PP, BARBOSA JLP, FERNANDES KPS, OLIVEIRA TS, BUSSADORI SK, MESQUITA-FERRARI RA. *Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular*. Fisioterapia em Movimento Mar 2012, Volume 25 N° 1 Páginas 21 – 29. Doi: 10.1590/S0103-51502012000100003 .

72 – FERRARESI C, KAIPPERT B, AVCI P, HUANG YY, DE SOUSA MV, BAGNATO VS, PARIZOTTO NA, HAMBLIN MR. *Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12*

myotubes with a peak response at 3-6 h. Photochem Photobiol. 2015 Mar-Apr;91(2):411-6. Doi: 10.1111/php.12397.

73 – OSANA S, MURAYAMA K, NAGATOMI R. *The impact of intracellular aminopeptidase on C2C12 myoblast proliferation and differentiation.* Biochem Biophys Res Commun. 2020 Apr 9;524(3):608-613. Doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.115.

74 – COMINETTI MR, TERRUGGI CH, RAMOS OH, FOX JW, MARIANO-OLIVEIRA A, DE FREITAS MS, FIGUEIREDO CC, MORANDI V, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. *Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro.* J Biol Chem. 2004 Apr 30;279(18):18247-55. Doi: 10.1074/jbc.M311771200.

75 – D'ARCY MS. *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy.* Cell Biol Int. 2019 Jun;43(6):582-592. Doi: 10.1002/cbin.11137.

76 – BUSTILLO S, VAN DE VELDE AC, PERFUMO VM, GAY CC, LEIVA LC. *Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from Bothrops alternatus venom in C2C12 muscle cells.* Apoptosis. 2017 Apr;22(4):491-501. Doi: 10.1007/s10495-017-1350-x.

77 – RIBEIRO PH, ZULIANI JP, FERNANDES CF, CALDERON LA, STÁBELI RG, NOMIZO A, SOARES AM. *Mechanism of the cytotoxic effect of l-amino acid oxidase isolated from Bothrops alternatus snake venom.* Int J Biol Macromol. 2016 Nov;92:329-337. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.022.

78 – GOUVEIA VA, PISETTE FRFS, WAGNER CLR, DALBONI MA, DE OLIVEIRA APL, COGO JC, ZAMUNER SR. *Photobiomodulation reduces cell death and cytokine production in C2C12 cells exposed to Bothrops venoms.* Lasers Med Sci. 2020 Jul;35(5):1047-1054. Doi: 10.1007/s10103-019-02884-4.

79 – DA SILVA AGUIAR W, DA COSTA GALIZIO N, SANT'ANNA SS, SILVEIRA GPM, DE SOUZA RODRIGUES F, GREGO KF, DE MORAIS-ZANI K, TANAKA-AZEVEDO AM. *Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles.* Toxicon. 2020 Oct 30;186:67-77. Doi: 10.1016/j.toxicon.2020.07.030.

8. ANEXO



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Tratamento da regeneração muscular em modelo murino após a ação do veneno e toxinas das serpentes do gênero Bothrops, em seus estágios de desenvolvimento juvenil e adulto pela ação da irradiação com LED", protocolada sob o CEUA nº 8207061118 (ID 000092), sob a responsabilidade de **Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 05/12/2018.

We certify that the proposal "Treatment of muscle regeneration in murine model after the action of the venom and toxins of the snakes of the genus Bothrops, in their stages of juvenile and adult development by the action of irradiation with LED", utilizing 180 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 8207061118 (ID 000092), under the responsibility of **Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 12/05/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [12/2018](#) a [12/2020](#) Área: [Medicina](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [8 a 12 semanas](#)

N: [180](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

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

São Paulo, 25 de maio de 2021

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

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do laser de baixa intensidade no efeito local causado pelo veneno da serpente *Bothrops alternatus*, em seus estágios de desenvolvimento juvenil e adulto", protocolada sob o CEUA nº 7996170821 (p. 00002), sob a responsabilidade de **Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 25/08/2021.

We certify that the proposal "Effect of the low intensity laser on the local effect caused by venom of the snake *Bothrops alternatus*, in its juvenile and adult stages of development", utilizing 50 isogenics mice (50 males), protocol number CEUA 7996170821 (p. 00002), under the responsibility of **Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 08/25/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2021** a **09/2022** Área: **Medicina**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **50**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no biotério da Uninove.

São Paulo, 25 de agosto de 2021



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



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