

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

**LUCIANA MIATO GONÇALVES SILVA**

**Efeito do laser de baixa potência sobre células musculares C2C12 submetidas à lesão por veneno da serpente *Bothrops jararacussu*: mecanismos de reparo celular**

**SÃO PAULO-SP**

**2015**

**LUCIANA MIATO GONÇALVES SILVA**

**Efeito do laser de baixa potência sobre células musculares C2C12 submetidas à lesão por veneno da serpente *Bothrops jararacussu*: mecanismos de reparo celular**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Stella Regina Zamuner.

**SÃO PAULO-SP**

**2015**

Silva, Luciana Miato Gonçalves.

Efeito do laser de baixa potência sobre células musculares C2C12 submetidas à lesão por veneno de serpente *bothrops jararacussu*: mecanismo de reparo celular./ Luciana Miato Gonçalves Silva.

50 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Profª Drª Stella Regina Zamuner.

1. Células musculares. 2. Mionecrose. 3. Laserterapia. 4. Viabilidade e veneno de *bothrops jararacuçu*.

I. Zamuner, Stella Regina.

II. Título

CDU 616

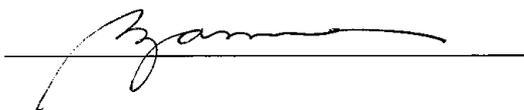
São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

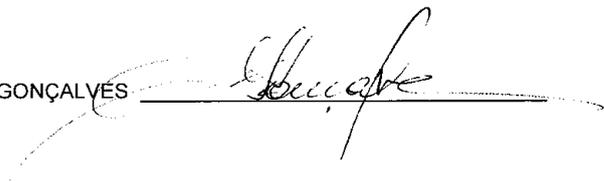
Aluno(a): Luciana Miato Gonçalves Silva

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa potência sobre células musculares C2C12 submetidas à lesão por veneno da serpente Bothrops Jararacussu: mecanismo de reparo celular".

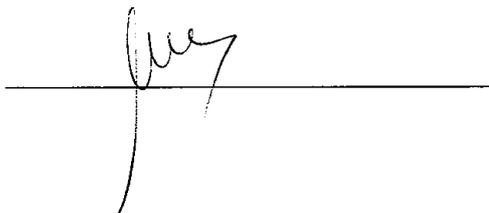
Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF. DR. LUIS ROBERTO CAMARGO GONÇALVES



Membro: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA CHAVANTES



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este estudo a Deus e ao Senhor Jesus por tudo o que tem feito em minha jornada, ao meu amado esposo a quem tem me dado muito apoiado e incentivado.

As minhas queridas professoras Silvia Zamuner e a Stella Zamuner, por esses anos de paciência e ensinamento.

Aos amigos que foram se somando ao longo desse percurso.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Nove de Julho, que me aceitou no Programa de Mestrado em Medicina.

À PROSUP/CAPES, pela bolsa de estudos, ao meu esposo que complementou financeiramente minha bolsa.

As minhas queridas professoras Silvia e Stella Zamuner pela paciência com que me ensinaram toda base científica que possuo hoje.

E aos amigos todos, que fizeram parte dessa jornada.

## RESUMO

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* causa manifestações patológicas sistêmicas e locais graves e complexas. O tratamento específico para o acidente botrópico é a utilização do antiveneno, o qual desempenha a função de neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, minimizando assim seus efeitos sistêmicos, porém sua ação não se estende as manifestações locais. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da FBM (Fotobiomodulação) em células musculares C2C12, submetidas à lesão por veneno de *B. jararacussu* quanto ao seu mecanismo de reparo celular. Para tanto, as células foram incubadas com o veneno (12,5 µg/mL) e imediatamente irradiadas com o laser Índio Gálio Alumínio Fósforo(λ) 685nm e Arseneto de Gálio Alumínio (λ) 830nm, e as células foram incubadas por 15, 30 e 60 minutos. Após esses períodos, foi avaliada a expressão das proteínas miogenina e MyoD, a liberação de ATP intra e extracelular, a avaliação das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1β por imunohistoquímica e proliferação celular pelo ensaio de Alamar Blue. Nossos resultados demonstraram que o FBM causou um aumento dos marcadores miogênicos miogenina e MyoD nos tempos de 30 e 60 min da incubação com o veneno. A FBM induziu os mioblastos a se diferenciar em miotubos e este efeito foi acompanhado por um aumento na regulação dos genes MyoD e miogenina. Além disso, a PBM foi capaz de reduzir o ATP Extracelular e aumentou o teor de ATP Intracelular após a exposição ao veneno. A FBM não foi capaz de reduzir a liberação de IL-6 em células C2C12. A FBM causou um efeito protetor nas células C2C12 contra a citotoxicidade do veneno e promoveu a diferenciação dessas células por aumentar fatores miogênicos. No entanto, não houve diferença estatística entre a irradiação com a FBM e o veneno para as proteínas IL-6, IL-1β, IL-8.

Palavras chaves: Células Musculares, Mionecrose, Laserterapia, Veneno de  
Bothrops jararacussu.

## ABSTRACT

The effect of snake venom by *Bothrops* is associated with serious pathological manifestations and complex sites. Specific treatment for *Bothrops* accident is the antivenom administration, which performs the neutralizing function by the greatest possible amount of venom circulating. Thus minimizing its systemic effects, but its response does not extend to the local manifestations. The aim of this study was to analyze the photobiomodulation effect (PMB) in C2C12 muscle cells subjected to injury by *Bothrops Jararacussu* venom therapy its cellular repair mechanism. For this, the cells were incubated with venom (12,5µg/mL) and immediately irradiated by PBM Aluminum Gallium Indium phosphorus and Aluminium gallium arsenide, wavelength ( $\lambda$ ) 685 nm and 830 nm and the cells were incubated for 15, 30 and 60 minutes. After incubation periods, were analysed cell proliferation, intra and extracellular ATP levels, expression of myogenic regulatory factors, such as MyoD and myogenin, as well as cellular differentiation were analysed. Results demonstrated that unirradiated cells, the venom caused a decrease in cell proliferation, indicating myonecrosis. Infrared and red laser considerably decrease venom-induced cytotoxicity. Laser irradiation induced myoblasts to differentiate into myotubes and this effect were accompanied by an up MyoD, regulation specially myogenin. Moreover, LLLT was able to reduce the extracellular ATP while increased the intracellular ATP content past venom exposure. PMB did not modify the release of IL-6 induced by the venom. PBM caused a protective effect on C2C12 cells against the cytotoxicity caused by *B. jararacussu* venom, this as well and promoted these differentiation cells by up regulate myogenic factors.

**Key words:** muscle cells, myonecrosis, lasertherapy (LLLT), viability, Venom *B. jararacussu*.

## **LISTA DE ABREVIÇÕES**

**ATP-** adenosina tri-fosfato

**BJss-** *Bothrops jararacussu*

**Bth TX I e II** – miotoxinas botrópicas I e II

**C2C12-** células musculares

**Ca<sup>2+</sup>** - cálcio

**DNA-** ácido desoxirribonucleico

**FBM-** fotobiomodulação

**Fmol-** femtomole- unidade de medida 10<sup>-15</sup>

**IL1 $\beta$** - interleucina 1beta

**IL-6-** interleucina 6

**IL-8-** interleucina 8

**K<sup>+</sup>**-potássio

**LTB4-** Leucotrieno B4

**LBP-** Laser de Baixa Potência

**LLLT-** Low level laser Therapy

**MMPs-** metaloproteinase

**PAF-** fator agregante plaquetário

**PGE2-** prostaglandina E2

**pH-** potencial hidrogeniônico

**PLA2-** fosfolipase A2

**RNA-** ácido Ribonucleico

**ROS-** espécies reativas de oxigênio

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

**TXA2-** Tromboxano A2

**VBJ-** veneno de bothrops jararacussu

**WHO-** organização mundial de saúde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1 Bothrops Jararacussu .....	10
1.2 Lesão e reparo tecidual .....	11
1.3 Soroterapia.....	12
1.4 Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP).....	13
1.5 LBP e acidentes ofídicos .....	14
1.6 Laser e reparo tecidual.....	15
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivo Específico.....	16
3. 0 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Veneno da Serpente Bothrops Jararacussu (VBJss).....	17
3.2 Células Musculares C2C12 .....	17
3.3 Cultivo Celular.....	17
3.4 Preparação de monocamadas de células para o ensaio com o Veneno .....	18
3.5 Irradiação laser de baixa potência.....	19
3.6 Análise da proliferação celular pelo método do <i>Alamar Blue</i> .....	21
3.7 Ensaio para a expressão de proteínas Myod e Miogenina.....	22
3.8 Ensaio para Determinação de ATP intra e extracelular.....	23
3.9 Ensaio para imunohistoquímica de proteínas Myod e Miogenina.....	23
3.10 Análise Estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
Figura 1.0 .....	20
Figura 2.0 .....	24
Figura 3.0.....	26

Figura 4.0 .....	28
Figura 5.0 .....	30
Figura 6.0 .....	32
Figura 7.0.....	33
Figura 8.0 .....	35
Figura 9.0 .....	36
Figura 10.0 .....	37
5. DISCUSSÃO.....	38
6.RESUMO DOS RESULTADOS.....	43
7. CONCLUSÃO.....	44
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes causados pôr serpentes peçonhentas constituem um sério problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo (Funasa, 2001).<sup>(1)</sup>A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo(Funasa, 2001).<sup>(1)</sup>. Assim, devido a sua incidência e gravidade, em 2009, a organização mundial da saúde (WHO) incorporou o envenenamento por serpentes na lista de doenças tropicais negligenciadas ([www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en)).

As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos na América Latina pertencem ao gênero *Bothrops*, da família *Viperidae*. No Brasil, aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos são provocados por serpentes desse gênero, sendo também consideradas as mais agressivas.<sup>(2)</sup> No Brasil são aproximadamente 20.000 casos de envenenamento ofídico registrados anualmente.<sup>(1-2)</sup> Os acidentes causados pelas serpentes botrópicas não apresentam alta letalidade (0,31 %), porém devido à alta incidência, são consideradas de grande importância epidemiológica no país <sup>(1-3)</sup>. Sua distribuição geográfica é ampla no território nacional, sendo encontrados predominantemente na região sul e sudeste.<sup>(1-4)</sup>No Brasil, estão coletadas, 256 espécies de serpentes, sendo 69 espécies venenosas/peçonhentas, dessas 187 são não venenosas.<sup>(4)</sup>

O envenenamento pela espécie *Bothrops* leva a manifestações sistêmicas caracterizadas por náuseas, vômitos, sudorese, hemorragia, hipotensão arterial, insuficiência renal e, ocasionalmente, choque, além de graves manifestações locais como dor, edema de instalação precoce e caráter progressivo, equimoses, hemorragia, hipóxia e necrose tecidual <sup>(5-6)</sup>. A necrose muscular é um efeito local

relevante, pois pode resultar em uma perda irreversível da função ou do próprio tecido, havendo a possibilidade de amputação do membro afetado.<sup>(6-7)</sup>

A mionecrose local é uma consequência comum nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*. A literatura indica que a mionecrose é causada por uma família de proteínas denominadas miotoxinas. Os componentes dos venenos botrópicos, as quais possuem características de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, por se ligarem e alterarem a membrana plasmática. As PLA<sub>2</sub> hidrolisam fosfolipídeos de membranas, gerando precursores de mediadores importantes para o processo, inflamatório como prostaglandina, tromboxanas, leucotrienos e outros.<sup>(7-8)</sup>

As PLA<sub>2</sub> presentes nos venenos de serpentes apresentam diversos efeitos fisiológicos como: neurotoxicidade, miotoxicidade, inflamação, hipotensão e hemorragia interna, atividade antiplaquetária e anticoagulante.<sup>(6)</sup> Essas miotoxinas induzem aumento no dano tecidual proeminente, de forma que, as alterações morfológicas são observadas a partir de 15 minutos de sua injeção.<sup>(9)</sup> Devido a ação da PLA<sub>2</sub> iniciar a cascata inflamatória, ocorre um aumento da permeabilidade microvascular com recrutamento de leucócitos no tecido, com a liberação de mediadores inflamatórios. Neste sentido, esse processo resulta na liberação do ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, iniciando uma série de reações inflamatórias. A miotoxicidade pode, ainda, ser consequência da isquemia dos vasos da microcirculação e de artérias intramusculares.<sup>(10)</sup> O efeito anticoagulante ocorre pela hidrólise e destruição da superfície da membrana necessária para a formação do complexo de coagulação de vasos, causando isquemia, a desorganizam dos fosfolipídeos, que irá induzir o influxo de Ca<sup>2+</sup> agindo na membrana sarcoplasmática.<sup>(9)</sup>

A literatura demonstra ainda que a mionecrose ocorrida pela picada de serpentes botrópicas pode ser causada pela ação direta da PLA2 miotóxicas em membranas plasmáticas das células musculares ou por causa indireta, através da ação das metaloproteinases (MMPs). As MMPs, também denominadas hemorraginas, constituem uma classe de enzimas que depende de íons metálicos, principalmente, o zinco ( $Zn^{2+}$ ), estes metais atuam sobre os substratos e são relevantes na fisiopatologia do envenenamento por apresentarem atividades fibrinolítica, pró-coagulante, mionecrótica e hemorrágica.<sup>(11-12)</sup> A literatura mostra que estas toxinas afetam a parede dos vasos de pequeno calibre <sup>(12,13)</sup> e a destruição enzimática da membrana basal, que circunda esses vasos, parece ser o principal fator responsável pela lesão. Foi demonstrado que as MMPs de veneno degradam *in vitro* alguns constituintes da membrana basal, como o colágeno do tipo IV e o nidogênio levando à descontinuidade do endotélio. As metaloproteinases podem, ainda, hidrolizar a laminina e a fibronectina presentes na matriz extracelular.<sup>(14)</sup> Essas proteases induzem além da hemorragia, mionecrose, danos na pele e inflamação, degradam componentes da matriz extracelular e prejudicam a regeneração do músculo esquelético afetado.<sup>(15)</sup> Adicionalmente, foi demonstrado que as MMPs dos venenos são capazes de ativar as MMPs endógenas, através da quebra de seu precursor. Uma vez que as MMPs são relevantes para a degradação e remodelagem da membrana basal, o aumento da sua expressão, durante o envenenamento, pode contribuir para a lesão do tecido através da degradação da matriz extracelular.

A reação inflamatória local é caracterizada presença de edema, influxo leucocitário e dor. O edema, induzido por veneno botrópico, é caracterizado por exsudação de proteínas plasmáticas, decorrentes da síntese e/ou liberação de

mediadores endógenos, como: histamina, serotonina, eicosanoides, fator ativador de plaquetas (PAF), além de ativadores de receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ 2.<sup>(16-17)</sup> O recrutamento e ativação de leucócitos induzido pelo envenenamento botrópico foi relatado por diversos autores. Flores et al<sup>(18)</sup> demonstraram que a administração dos venenos de *B. erythromelas* e *B. alternatus* causam migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos. Acosta de Pérez et al<sup>(19)</sup> mostraram um infiltrado leucocitário, composto principalmente de neutrófilos, em músculo gastrocnêmio de ratos, após a injeção do veneno de *B. jararaca* da Argentina. Ademais, foi demonstrado que os venenos botrópicos induzem a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), mediadores lipídicos, como: prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2) e leucotrieno B4 (LTB4).<sup>(20-21-22)</sup> Os venenos botrópicos, além de induzirem a liberação de mediadores inflamatórios, podem, eventualmente, ativar mecanismos intracelulares naquelas células, que induzem a geração de substâncias capazes de ampliarem seu efeito lesivo.<sup>(23)</sup>

### **1.1 *Bothrops jararacussu***

A serpente *Bothrops jararacussu* está distribuída na América do Sul, habitando a mata Atlântica. Essa serpente causa 0,8 a 10% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil.<sup>(24)</sup> O envenenamento causado por esta serpente tem grande mortalidade, quando comparada com outras serpentes do mesmo gênero,<sup>(25)</sup> sendo que o grande nível de letalidade, esta atribuída aos 30% de miotoxinas encontrada no veneno.<sup>(26)</sup> A mionecrose é o efeito local mais acentuado causado por este envenenamento.<sup>(27)</sup> Ademais, os estudos experimentais mostram que o veneno dessa serpente causa necrose muscular, a partir das miotoxinas encontradas no

veneno que atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, causando dano tecidual proeminente.<sup>(6)</sup>

## **1.2 Lesão e reparo tecidual**

Nas situações de lesão muscular, o processo de formação do novo tecido requer que células mononucleadas quiescentes precursoras se tornem ativas, proliferem, se diferenciem em mioblastos e se fundam para formar os miotubos. Subsequentemente, os miotubos irão sofrer diferenciação e maturação para formar fibras musculares funcionais e reparar as miofibrilas danificadas.<sup>(28-29)</sup>

A Miogênese é um processo regulamentado por fatores de transcrição miogênico básico, através da família hélice-alça-hélice (MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4), chamados de fatores de regulação miogênica (MRFs) e fator estimulante miócito 2 (MEF2), que regulam a expressão de vários genes músculo-específicos, como a miosina de cadeia pesada (MHC) e creatina quinase.<sup>(24-30)</sup>

As células da linhagem miogênica em proliferação, positivas para Myf5 e/ou MyoD, são denominadas de mioblastos.<sup>(31)</sup> Os mioblastos tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão de miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células.<sup>(31)</sup> Finalmente, no processo da miogênese, os miócitos mononucleados se fundirem para formar os miotubos e, o músculo esquelético, tornar-se um tecido altamente especializado caracterizado por fibras musculares multinucleadas.<sup>(32)</sup> Ainda, a MyoD é expressada no tecido estriado vivo em várias situações em resposta a diversos estímulos, sugerindo que desempenhe um papel importante na plasticidade deste tecido.<sup>(33)</sup>

A linhagem C2C12 é um subclone da linhagem de células musculares C2, isoladas de células-satélites de camundongos adultos.<sup>(34)</sup> Assim, os mioblastos da linhagem C2C12 são um bom modelo, para o estudo do crescimento e diferenciação

celular as quais, apresentam a maioria das características de células musculares normais. (35-36)

### 1.3 Soroterapia

O tratamento preconizado para o acidente botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico, que é altamente eficaz contra os efeitos sistêmicos, no entanto, não neutralizam com eficiência os efeitos locais. Os estudos experimentais têm sugerido que existe uma significativa, embora parcial, neutralização da hemorragia, edema e mionecrose apenas quando o antiveneno é administrado rapidamente após o envenenamento.<sup>(37)</sup>

Neste sentido, Camey et al, <sup>(37)</sup> estudaram o efeito farmacológico do veneno de cinco espécies botrópicas brasileiras e verificaram que o antiveneno foi efetivo na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. Porém, os efeitos locais não são neutralizados pelo uso de antiveneno e os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, até o momento, não foi esclarecido.

Devido à falta de proteção local pelo soro antibotrópico, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia. Uma possibilidade que começa a ser investigada, na neutralização dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos, é a utilização de fotobioestimulação.<sup>(5-38-39)</sup> Nosso grupo de pesquisa e outros têm relatado sobre os benefícios da fotobioestimulação no efeito local induzido por veneno botrópico. Neste sentido, estudos efetuados com o laser de baixa potência (FBM) mostraram uma diminuição da mionecrose,<sup>(5-40-41-42)</sup> inflamação,<sup>(40-43)</sup> dor,<sup>(40-43)</sup> e hemorragia<sup>(44)</sup> após a injeção de diferentes espécies de veneno botrópico, *in vivo*. Embora, diferentes estudos tenham mostrado a eficácia da laserterapia contra a reação local induzida por venenos botrópico, o mecanismo pelo qual a fotobioestimulação exerce seus efeitos, não é conhecido.

#### **1.4 Terapia com laser de baixa potência (LBP)**

A palavra *laser* é uma sigla que corresponde “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, (Óptica) a qual significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada por Radiação.”<sup>(45)</sup> A ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular, quando o laser é aplicado nos tecidos a luz é absorvida por Fotoceptores localizados nas células, são capazes de modular as reações bioquímicas específicas dentro da célula e estimular uma série de reações em cadeia mitocondrial, resultando em síntese de ATP.<sup>(41-46)</sup> A terapia com o FBM é considerada como um recurso biomodulação dos tecidos, por meio de seus efeitos biológicos, tais como anti-inflamatórios, cicatrizantes e analgésicos.<sup>(45)</sup>

A FBM estimula um grande número de processos biológicos incluindo o crescimento celular, a proliferação<sup>(42)</sup> e a diferenciação<sup>(47-48)</sup> *in vitro*. O efeito na proliferação pelo FBM tem sido estudado em vários tipos celulares, como os fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, células musculares, mioblastos e outros tipos celulares<sup>(42-46)</sup>. De acordo com Yu Ainda foi demonstrado que a irradiação do FBM estimula a proliferação de células satélites musculares, a angiogênese e expressão de fatores de crescimento, desempenhando assim uma função importante na regeneração muscular.<sup>(49)</sup>

#### **1.5 FBM e acidentes ofídicos**

Estudos demonstraram uma redução significativa de mionecrose induzida por veneno de *Bothrops jararacussu* e das miotoxinas BthTX- e II após tratamento utilizando LBP. Esse efeito do LBP foi verificado pela diminuição na concentração de creatina quinase e redução das áreas de mionecrose do músculo gastrocnêmico de

camundongos após a administração do veneno de *Bothrops jararacussu*.<sup>(39-50)</sup> Esses dados corroboram os de Dourado et al.,<sup>(38)</sup> que demonstraram uma diminuição considerável da mionecrose, que foi induzida pelo veneno de serpente *Bothrops moojeni* após tratamento com o FBM, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana plasmática<sup>(38)</sup> Ademais, Doin-Silva, et al. <sup>(5)</sup>, observaram que o tratamento com o FBM causou uma melhora da transmissão neuromuscular e uma redução do desenvolvimento de mionecrose, induzida pelo veneno de *B. jararacussu* na preparação de nervo-músculo *in situ*.

Ainda, foi demonstrado a eficácia do FBM na resposta inflamatória local e hemorragia após lesão por veneno de *Bothrops jararacussu*<sup>(51)</sup> e *Bothrops moojeni*<sup>(44)</sup> no qual os camundongos foram submetidos à laserterapia combinada com antiveneno, resultando em diminuição de edema, redução do influxo leucocitário e hemorragia após a lesão. Esses dados sugerem que, o FBM possa ser uma ferramenta promissora para minimizar a gravidade dos efeitos locais do envenenamento botrópico.

### **1.6 Laser e reparo tecidual**

O processo de reparo constitui uma reação tecidual dinâmica, a qual compreende diferentes fenômenos, tais como: inflamação, proliferação celular e síntese de elementos constituintes da matriz extracelular, incluindo as fibras colágenas, elásticas e reticulares.<sup>(52)</sup>

Atuando em nível celular, o laser de baixa potência provoca modificações bioelétricas, bioenergéticas e bioquímicas, atuando no aumento do metabolismo, na proliferação e maturação celular, na quantidade de tecido de granulação e na

diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização.<sup>(53-54)</sup>

Entre os efeitos bioestimulantes mediados pelo laser de baixa potência no processo de reparo tecidual, destacam-se: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo à produção de colágeno por estas últimas células; a inibição secretória de alguns mediadores químicos; e a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local.<sup>(48-53)</sup>

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Geral:**

Este projeto tem como objetivo geral ampliar o conhecimento das ações do laser de baixa potência sobre células musculares submetidas à lesão por veneno de *Bothrops jararacussu*.

### **2.2 Específicos**

Através de ensaios *in vitro*, foram avaliados os efeitos da irradiação do laser de baixa potência sobre células musculares C2C12, após lesão com o veneno de *Bothrops jararacussu* quanto a:

I- Análise da proliferação celular pelo método do *Alamar Blue*.

II- Expressão de MyoD e Miogenina, pelo método de Western Blotting.

III- Expressão de ATP intracelular e extracelular.

IV- Expressão de IL-6, IL-1 beta, MyoD e Miogenina por imunohistoquímica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

**3.3 Cultivo Celular:** Os mioblastos foram mantidos em estufa (HEPA class 3110, ThermoElectron Corporation, Marietta, OH, EUA) a  $37^{\circ}\text{C}$ , numa atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornou subconfluyente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM;

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO 1,4mM; pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente a ressuspensão em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e sendo utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%. A seguir, foram feitas diluições necessárias à semeadura das células, em placas de cultura de 96 poços.

#### **3.4 Preparação de monocamadas de células musculares para ensaios com o**

**veneno:** A partir das culturas celulares obtidas como descrito no item 3.3, foram feitas as diluições necessárias para a semeadura das células em placas de 96 poços ou lamínulas de vidro. Assim,  $1 \times 10^4$  célula/poço foram semeadas em placas de 96 poços e colocadas em estufa uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 horas. Após esse período as células foram incubadas com o veneno, diluídos em meio DMEM, na concentração de 12,5 µg/mL<sup>(49)</sup>, ou meio DMEM somente (controle) e incubadas por 15', 30' e 60 minutos.

**3.5 Fotobiomodulação (FBM):** O dispositivo laser utilizado foi Laser Diodo( da DMC® modelo TheraLase), os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos do Laser.

Equipamento: Thera Lase®

<i>Parâmetros</i>	<i>Laser Vermelho</i>	<i>Laser Infra-vermelho</i>
Comprimento de onda (nm)	685	830
Densidade de energia(J/cm <sup>2</sup> )	3,7	4,0
Energia total (J)	1,6	1,3
Potência (mW)	35	100
Densidade de Potência (W/cm <sup>2</sup> )	0,4	0,4
Área irradiada (cm <sup>2</sup> )	0,3	0,3
Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	0,028	0,028
Modo de aplicação	Pontual	Pontual
Tempo de irradiação (s)	30	13

As células foram irradiadas imediatamente após a adição do veneno na cultura, e foi aplicada de forma pontual, uma única vez, diretamente no poço pela parte inferior da placa. Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa (fig. 1).

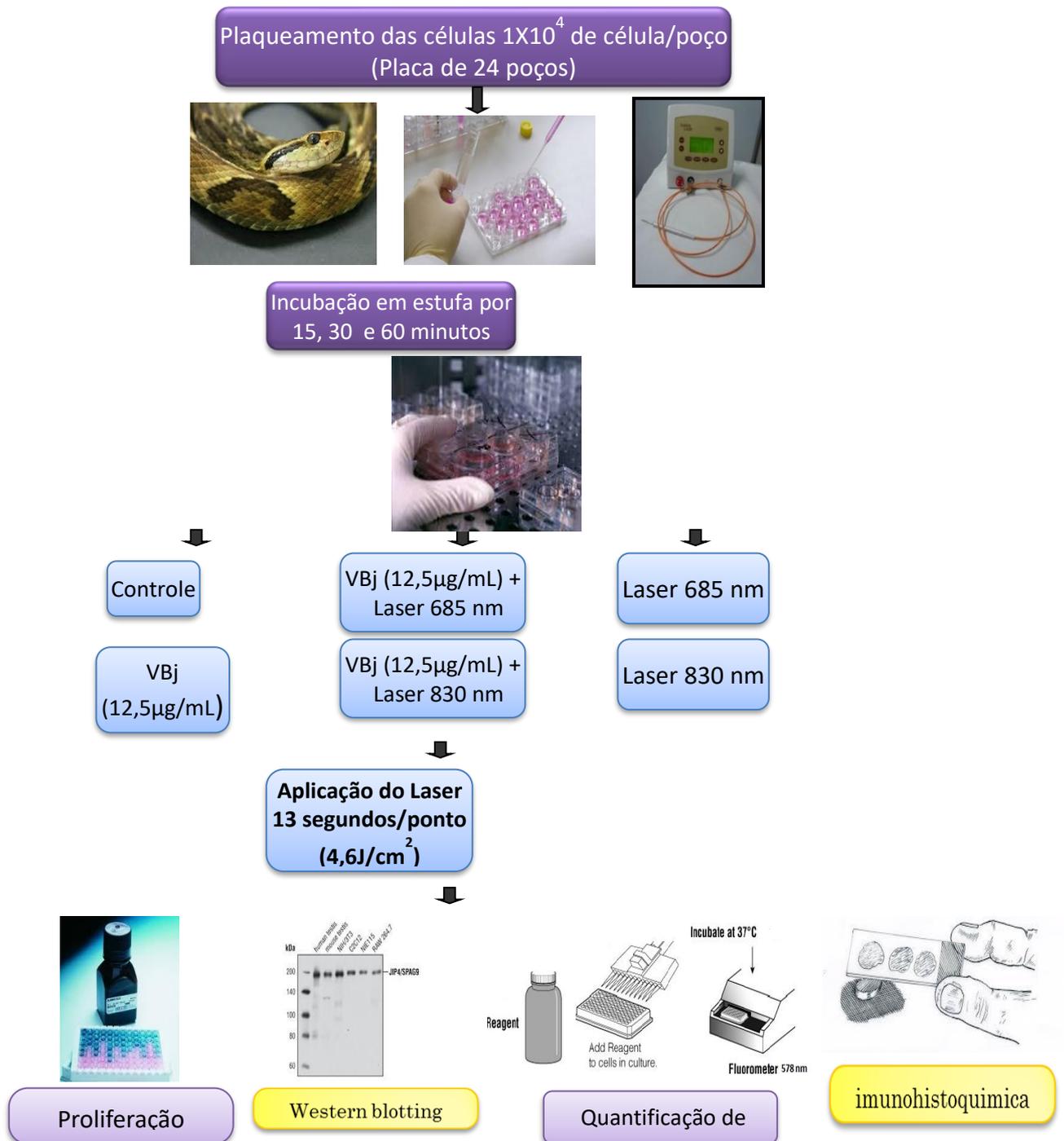
A cultura de mioblastos foi dividida em quatro grupos:

Grupo 1: controle receberam somente meio de cultura

Grupo 2: células receberam veneno de VBj;

Grupo 3: células que receberam VBj e tratamento com laser ( $\lambda$  685 nm);

Grupo 4: células que receberam VBj e tratamento com laser ( $\lambda$  830 nm).



**Figura 1-** Esquema representativo do protocolo experimental.

### **3.6 Análise da proliferação celular pelo método do *Alamar Blue*.**

A proliferação celular foi avaliada por espectrofotometria através do ensaio colorimétrico de oxidação-redução da resazurina (Sigma) (comercialmente designado por *Alamar Blue*®). Na sua forma oxidada, a resazurina apresenta-se como um composto de cor azul e não fluorescente. Ao ser reduzido é convertido em resorufina, um composto cor-de-rosa e altamente fluorescente. A resazurina, ao ser incorporada pelas células, atua como um aceitador intermediário de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV. Como resultado, este composto pode ser reduzido intracelularmente, na presença de enzimas mitocondriais. A determinação da redução do composto permite assim avaliar a variação na atividade metabólica das células, bem como a variação da proliferação celular. Desta forma, para avaliar o efeito FBM na proliferação celular, as células foram incubadas com o veneno com o descrito na secção 3.4, em placas de cultura com 24 poços, após o tempo de incubação, acrescentou-se 0,1 mg/mL de resazurina ao meio de cultura, numa proporção de 1/10 (v/v) para um volume final de 1 mL. No final de cada período de incubação de 3, 24, 48 e 72 horas, retiraram-se 200 µL de meio de cultura de células tratadas, e respetivos controlos positivos (células não tratadas) e negativos (meio cultura com 10% de solução de resazurina em PBS) para uma microplaca, a fim de avaliar a redução da resazurina. Para o efeito foi utilizado o espectrofotómetro de microplacas SpectraMax® Plus 384. A absorbância foi monitorizada a um comprimento de onda de 570nm (estado reduzido) e de 600 nm

(estado oxidado). A proliferação celular foi calculada, em função da percentagem de células não tratadas (controle), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% = \frac{[(A_{570} - A_{600})_{amostra}] - [(A_{570} - A_{600})_{branco}]}{[(A_{570} - A_{600})_{controle}] - [(A_{570} - A_{600})_{branco}]} \times 100$$

Os resultados obtidos representam a média mais ou menos ( $\pm$ ) desvio padrão de um mínimo de três ensaios independentes.

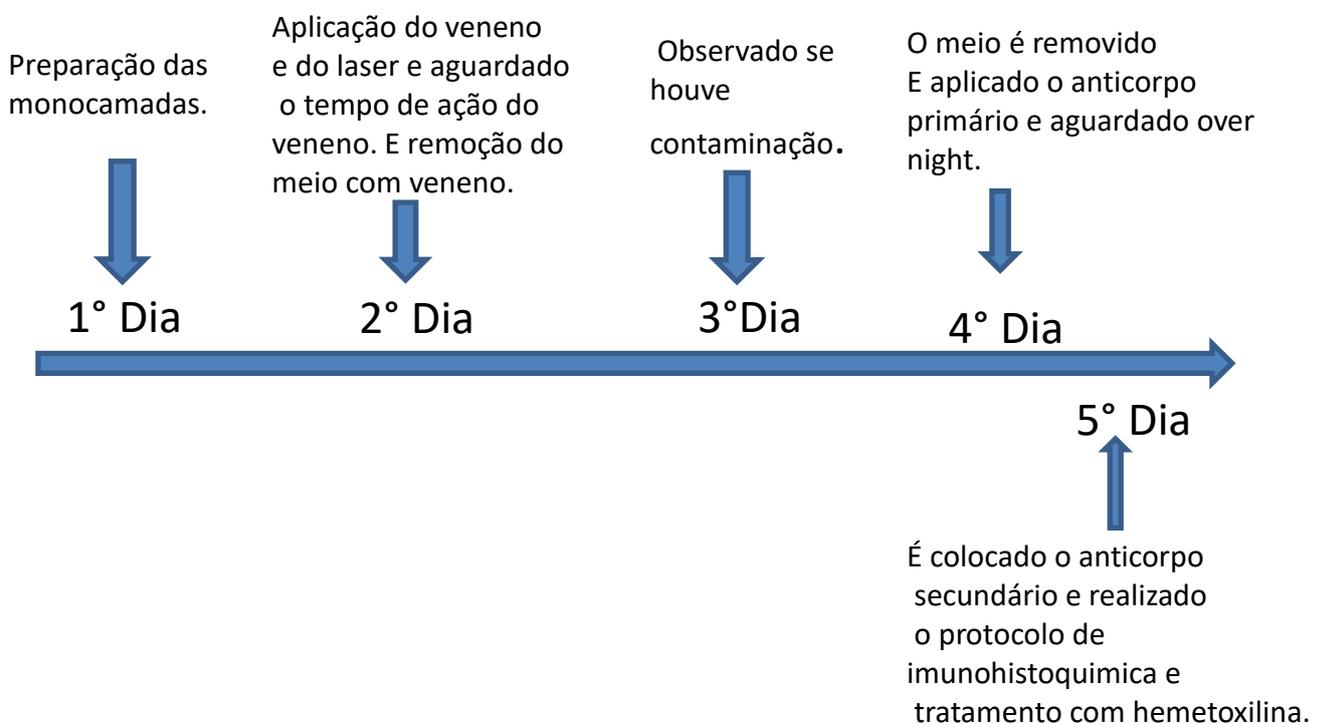
**3.7 Ensaio para expressão de proteínas IL-6, MyoD e miogenina:** Foi realizada a coleta das células, para o ensaio de expressão de proteínas MyoD e miogenina, após 3 dias da incubação com o veneno e aplicação do laser nas placas de cultura (item 3.5). Para tanto, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e lisadas com tampão RIPA [10 mM Tris (pH 7,4), 150 mMNaCl, 1 mM de ácido etileno glicol tetraacetic, sulfato de sódio a 0,1% de dodecil (SDS), 1 mMNaF, 1 mMortovanadatode sódio, 1 mM de fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mg/mL de aprotinina, e 1 mg/] leupeptinamL. Neste tampão, NaF e PMSF foram os inibidores da fosfatase e inibidor de serina protease, respectivamente. A suspensão celular foi colocada em gelo por 20 min e centrifugado a  $10.000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ C$ . Utilizado o sobrenadante para os experimentos. Um montante igual (40 mg) de proteína foi separada por 10% SDS-PAGE e eletrotransferidas em membrana de difluoreto de polivinilideno (0,2 m) com tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris, metanol 20%, pH 8,3), seguido de bloqueio em TBST (Tris-buffered saline/Tween-20) tampão (20 mM Tris, 150 mMNaCl, 0,01% Tween-20, pH 7,5) suplementado com leite em pó desnatado (5%). As membranas foram sondadas com os anticorpos

primários anti-MyoD (ABCAM, EUA; Ab16148), anti-miogenina (ABCAM, EUA; Ab1835) e  $\beta$ -actina (Santa Cruz), durante a noite a 4° C, seguido de incubação com anticorpo secundário anti-rato conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz, Califórnia, EUA). Os borrões foram desenvolvidos usando um sistema de detecção aprimorado quimioluminescência reagente de acordo com o protocolo do fabricante (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software Image J.

**3.8 Ensaio para determinação de ATP intra e extracelular:** A medida de ATP intra e extracelular foi realizada através da técnica de quimioluminescência utilizando-se o kit ATPLite da Perkin Elmer. Resumidamente, para avaliação dos níveis de ATP extracelular, o sobrenadante das culturas celulares foram coletados e transferidos para uma placa de 96 poços branca/opaca, seguido da adição de 50  $\mu$ l do substrato. Após 10 minutos de agitação, a placa foi lida em um luminômetro por 10 segundos para cada poço, e a contagem de fótons de amostra foi convertida em unidades de fmol de ATP por ml de meio. Para a avaliação dos níveis intracelulares de ATP, anteriormente a coleta do sobrenadante, as células foram lisadas utilizando-se uma solução de lise especial do kit ATPLite da Perkin Elmer, seguindo-se então do mesmo protocolo para medida dos níveis de ATP extracelular.

**3.9 Ensaio para imunohistoquímica de proteínas IL-6, IL-8, IL-1 beta, MyoD e Miogenina:** O ensaio de expressão de proteínas MyoD e miogenina foi realizado após 3 dias da incubação com o veneno e aplicação do laser nas células. As células foram plaqueadas na quantidade de  $2 \times 10^3$  em cada poço (placa de 24 well), onde cada poço tinha uma lamínula estéril (0,13-0,16 mm GLASSCYTO) depositadas no fundo de cada poço e após foram mantidas em estufa por 24 horas para adesão celular. No quarto dia seguinte foi removido este meio e as células foram lavadas

com tampão PBS 1x (NaCl 140mM, KCl 2,5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM e pH 7.4) e realizada lavagem usando o diluente de anticorpos que vem com esta função. A incubação foi realizada por 24 horas à 4°C com os anticorpos primários diluídos em 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) ou diluente específico. No dia quinto foram lavadas 2X5' em TBS ou PBS, posteriormente, incubados com o anticorpo secundário, utilizando o tempo padronizado para cada marca (Vector – 30 min cada etapa em estufa 37 graus). Após esta incubação as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-AldrichChemie, Steinheim, Alemanha) por 5' a 10 min. Posteriormente, ocorreu uma lavagem em água corrente por 10 min e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) por até 2 min. As células foram analisadas, morfológicamente, por coloração de hematoxilina (fig. 2).

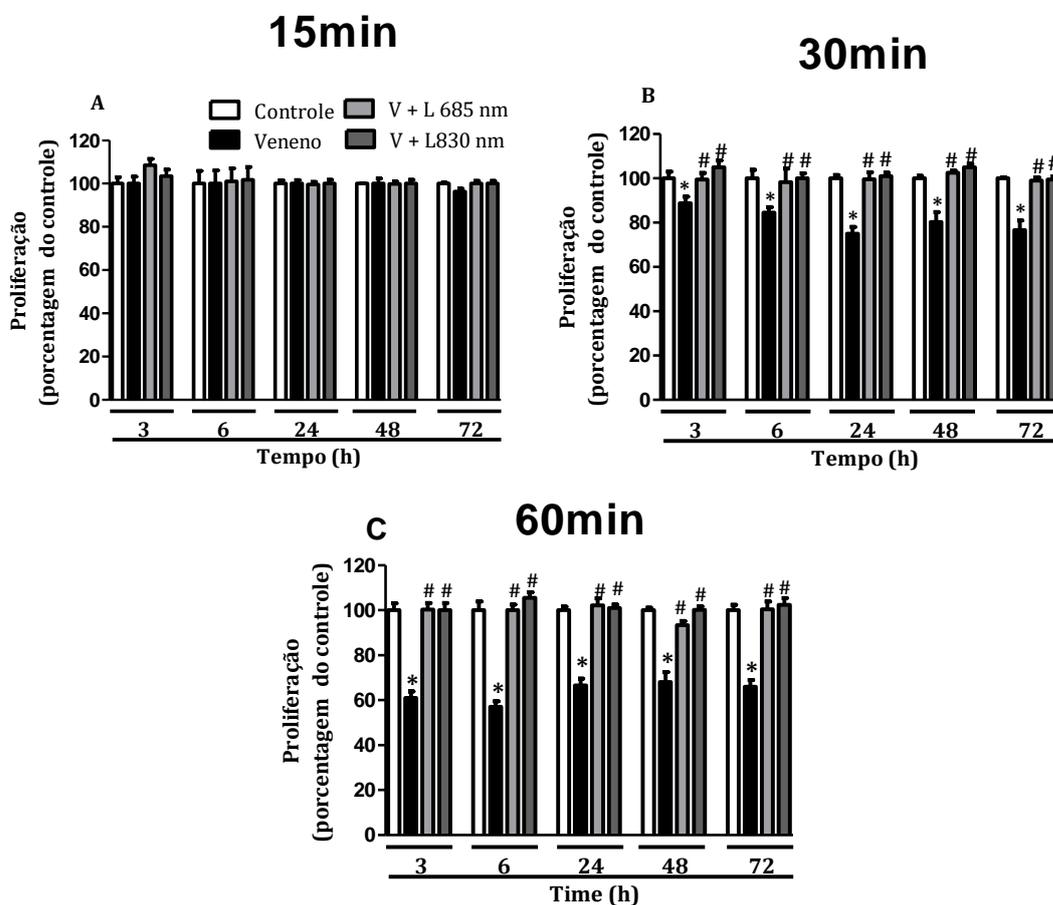


**Figura 2-** Esquema do protocolo de imunohistoquímica.

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

## 4. RESULTADOS

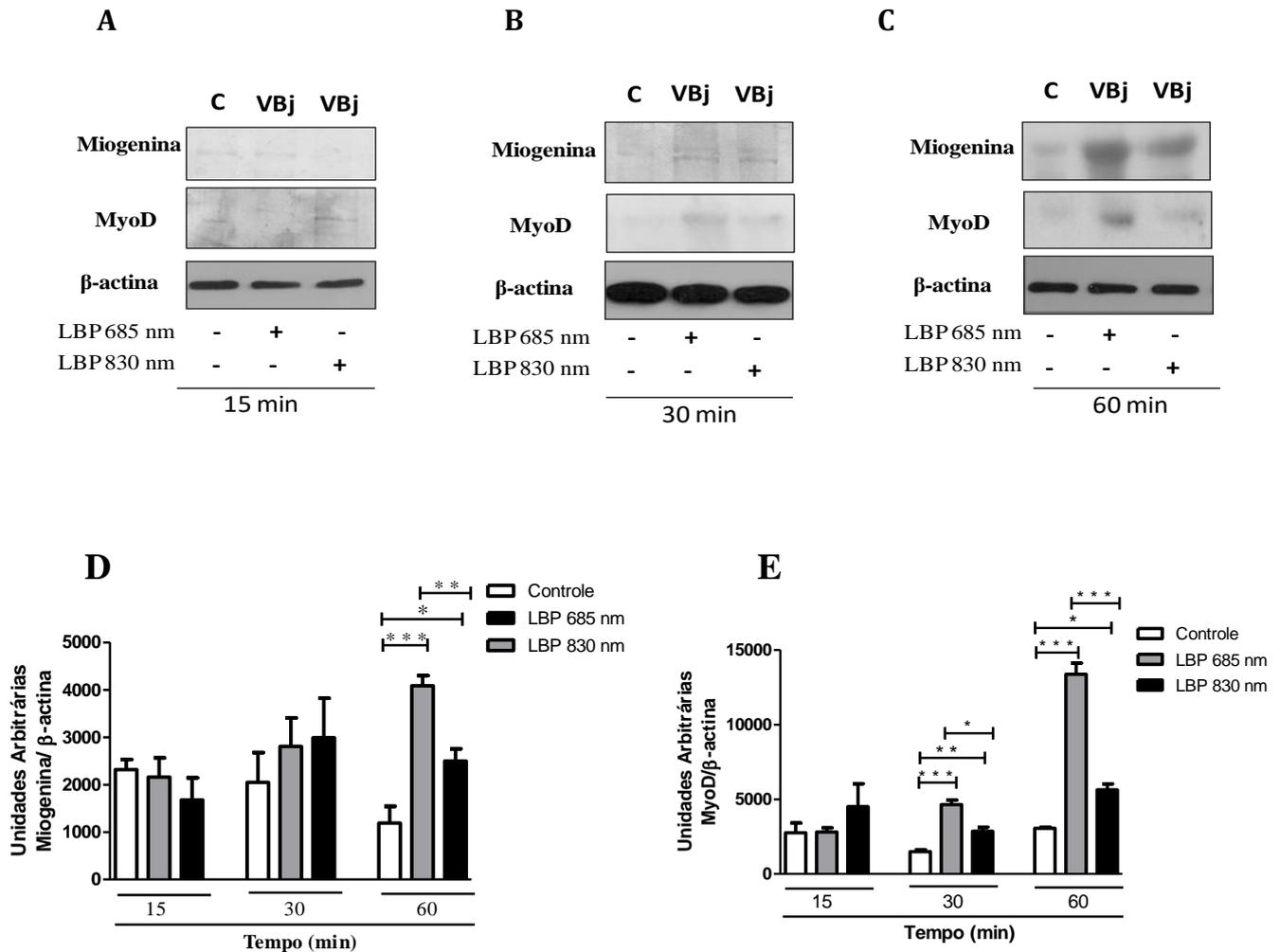
**4.1 Efeito da FBM sobre a proliferação de células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** A Figura 3 demonstra a proliferação das células após a incubação com o veneno *B.jararacussu* e imediatamente irradiadas com o laser nos comprimentos de onda 685 e 830nm, pode-se notar que não houve diferença entre o veneno e os tratamentos, no tempo de 15 min de incubação (Fig. 3A). Aos 30 min (Fig. 3B) e 60 min (Fig.3 C) houve uma redução na proliferação do grupo veneno que foi revertido com a irradiação a laser pelos dois comprimentos de onda utilizados.



**Figura 3- Efeito da FBM sobre a proliferação de células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o laser (685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). A análise da proliferação celular foi realizada no sobrenadante das células nos tempos de 3, 6, 24, 48 e 72 h seguindo o protocolo do Alamar Blue. # p < 0,05 em relação ao controle; \* p < 0,05 em relação ao veneno.

#### **4.2 Efeito da FBM sobre a expressão de MyoD e miogenina por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.**

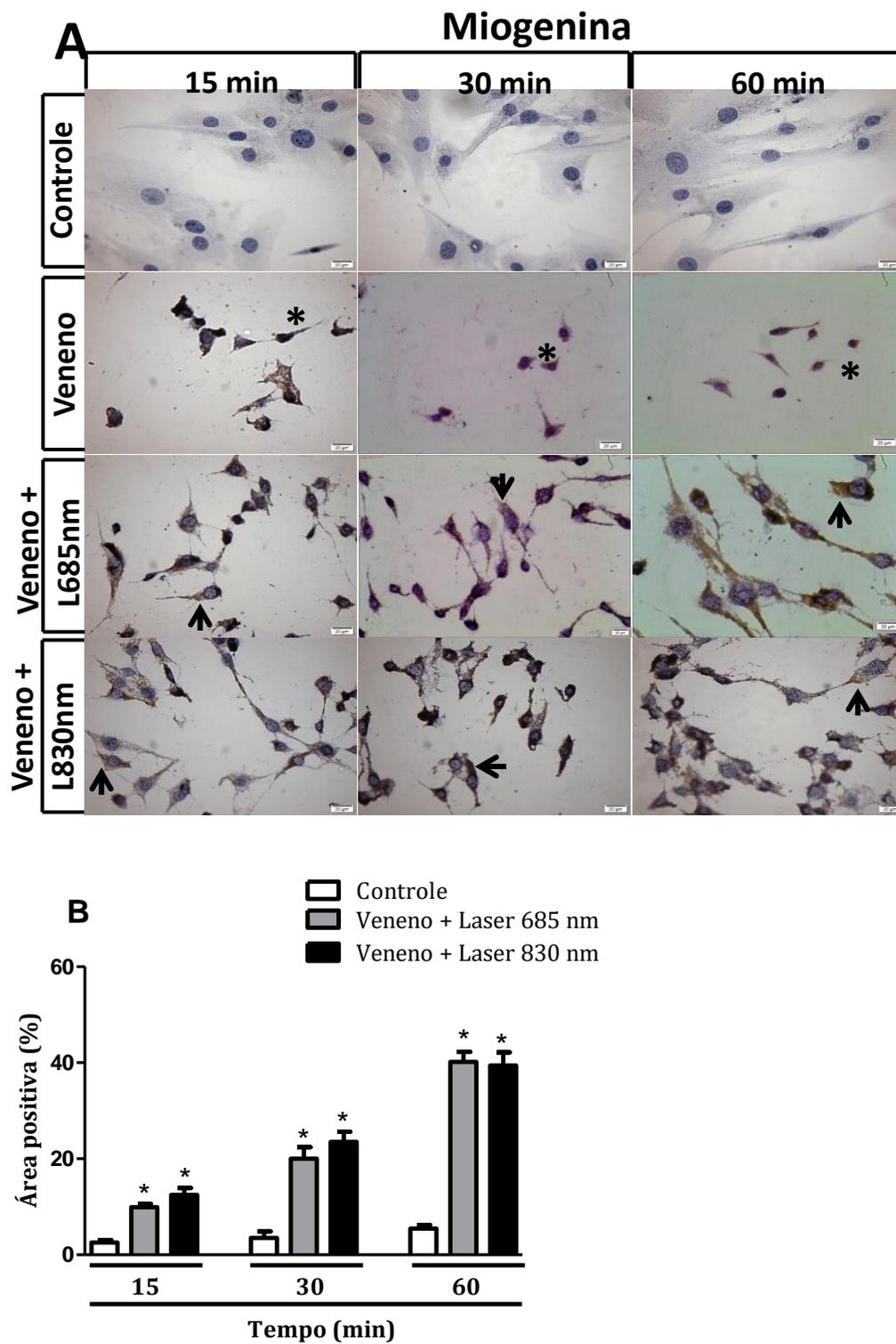
A expressão das proteínas MyoD e miogenina foi analisada por Western blot em células C2C12 coletadas 3 dias após a incubação com o veneno e tratamento com o laser 685 nm ou 830 nm, nos tempos de 15, 30 ou 60 min. O resultado demonstrou que células que foram incubadas com o veneno por 15 min e tratadas com o laser, não apresentou diferença estatística da expressão dessas proteínas em relação ao controle (Fig 4 A). No período de 30 min de incubação das células com o veneno, houve um aumento significativo da expressão da proteína MyoD mas não de miogenina pelos dois comprimentos de onda estudados (Fig. 4 B). No período de 60 min de incubação com o veneno e tratamento com o laser em ambos os comprimentos de onda causaram um aumento significativo da expressão de miogenina e MyoD por células C2C12 (Fig. 4 C). Ainda, pelos resultados obtidos, é possível observar que o laser no comprimento de onda 685 nm apresentou uma banda mais intensa quando comparada ao comprimento de onda 830 nm em todos os períodos de tempo onde ocorreu um aumento da expressão dessas proteínas (Fig. 4 D e E).



**Figura 4 - Efeito da FBM na expressão das proteínas miogenina e MyoD por células C2C12.** As células foram coletadas 3 dias após a incubação do veneno de *B. jararacussu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o FBM ou meio de cultura (controle). As células foram lisadas e submetidas a eletroforese e Western blot com anticorpo monoclonal anti-MyoD ou anti-miogenina (A, B e C). Western blot representativo (n= 3) de amostras de homogenato de células C2C12. (D) Intensidade das bandas de miogenina e (E) intensidade das bandas de MyoD quantificadas por densitometria dos homogenatos de células C2C12. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, Anova, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*,  $p < 0,001$ \*

### **4.3 Efeito da FBM sobre a imunexpressão de Miogenina por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.**

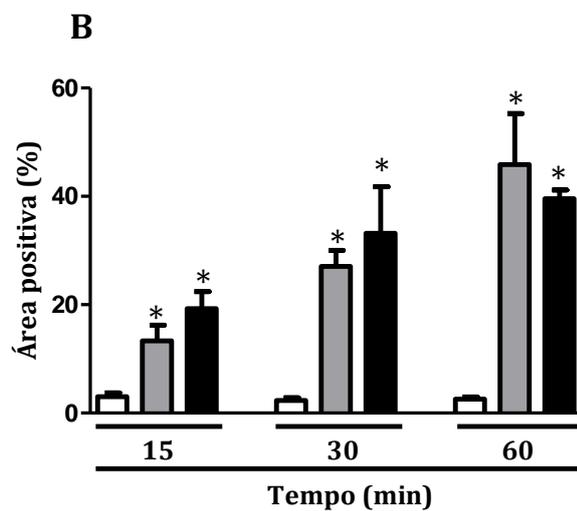
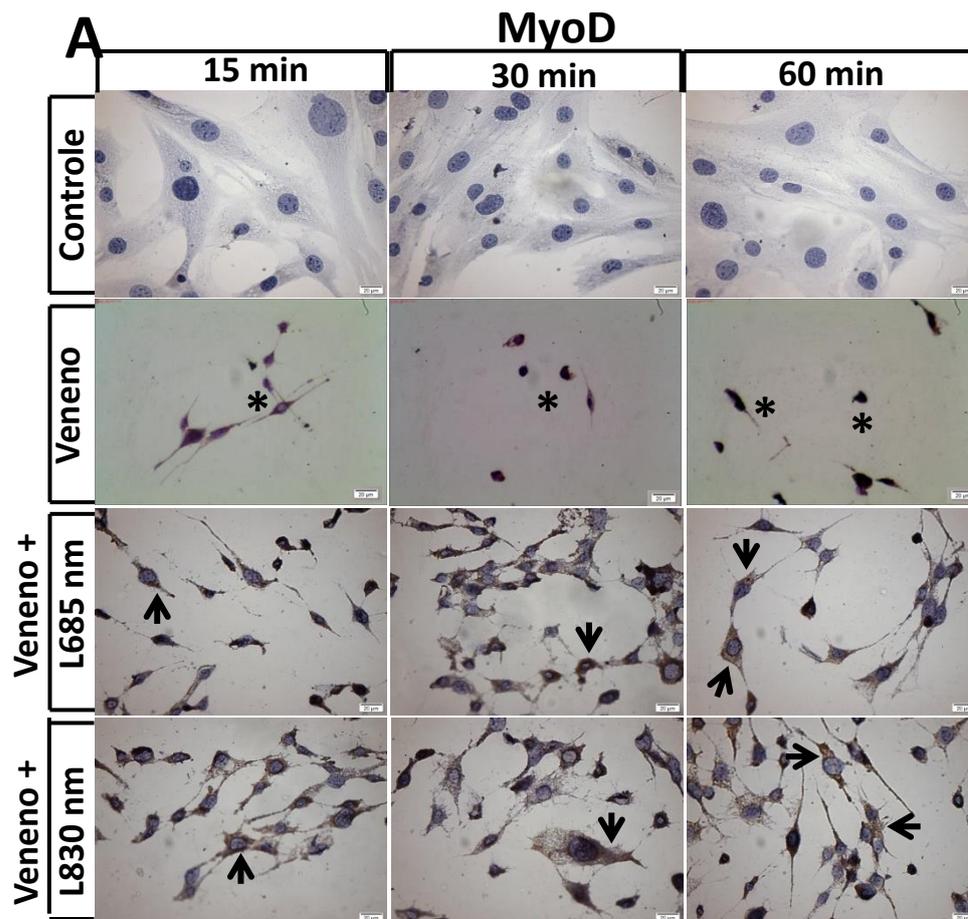
Os resultados da imunexpressão para miogenina estão resumidos na Figura 3. No grupo controle foi detectada uma fraca expressão de miogenina (Fig. 5A). No entanto, no grupo exposto ao veneno e irradiação a 4,6 J/cm<sup>2</sup>, foi detectado aumento da imunexpressão positiva para miogenina por ambos os comprimentos de onda utilizados (635 e 830 nm), na (Fig. 5A) e em todos os tempos analisados. A quantificação da coloração imunológica mostrou uma expressão significativamente maior de miogenina em células irradiadas em comparação com células controle (Fig. 5 B). Em relação à célula tratada com veneno sozinho, assim como ocorreu em experimentos de diferenciação, após 3 dias de indução da diferenciação, não havia células viáveis (\*), isto ocorreu em todos os períodos de incubação com o veneno.



**Figura 5: Efeito da FBM sobre a expressão de Miogenina em células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacusu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacusu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o laser (685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). As células foram então incubadas com anticorpo específico para a Miogenina. (A) Fotos com imunoexpressão; as setas indicam marcação positiva o (\*) células não viáveis; (B) Gráfico da quantificação da imunoexpressão. Barra= 20  $\mu$ m.

#### **4.4 Efeito da FBM sobre a imunexpressão de MyoD por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.**

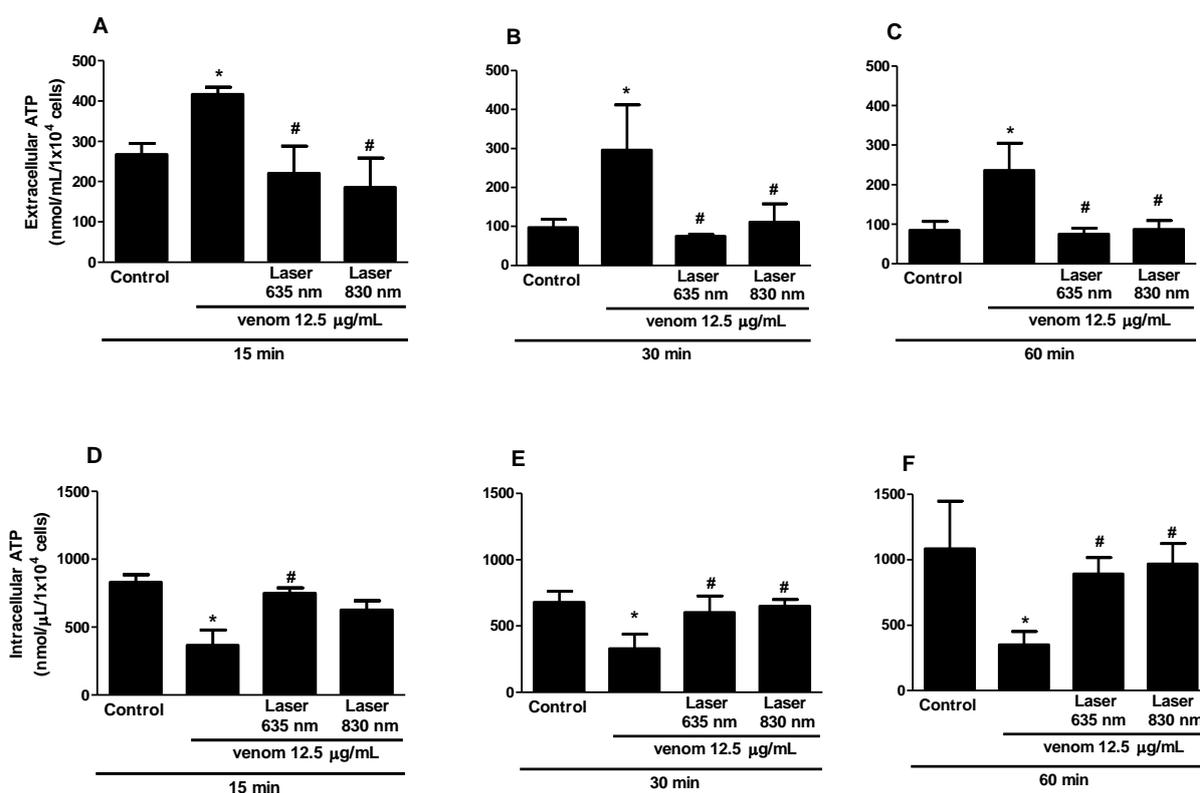
Os resultados da imunexpressão para MyoD estão resumidos na Figura 6. No grupo controle foi detectado uma fraca expressão de MyoD (Figura 6A). No entanto, no grupo exposto ao veneno e irradiação a 4,6 J/cm<sup>2</sup>, foi detectado imunexpressão positiva para MyoD por ambos comprimentos de onda utilizados (635 e 830 nm), observado na (Fig. 6A) em todos os tempos analisadas. Da mesma maneira que ocorreu com a miogenina, a quantificação da coloração imunológica mostrou uma expressão significativamente maior de MyoD em células irradiadas em comparação com células controle (Figura 6 B). Em relação à célula tratada com veneno sozinho, assim como ocorreu em experimentos de diferenciação, após 3 dias de indução da diferenciação, não havia células viáveis (\*), isto ocorreu em todos os períodos de incubação com o veneno.



**Figura 6: Efeito da FBM sobre a imunexpressão de MyoD em células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o laser (685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). As células foram então incubadas com anticorpo específico para a MyoD. (A) Fotos da imunexpressão; as setas indicam marcação positiva, (\*) células não viáveis; (B) Gráfico da quantificação da imunexpressão. Barra= 20  $\mu$ m.

#### 4.5 Efeito da FBM sobre a quantidade de ATP intra e extracelular em células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.

Para avaliar o mecanismo envolvido na citoproteção do laser observado no nosso modelo experimental, os níveis de ATP intra e extracelular foi avaliado no sobrenadante da cultura de células C2C12. Os resultados mostraram que as células expostas ao veneno apresentaram uma redução nos níveis de ATP intracelular, enquanto foi observado uma acumulação de ATP no meio extracelular, em todos os tempos analisados (Fig. 7). A irradiação com o laser vermelho mostrou um retorno aos níveis do controle tanto intra quanto extracelular, aos 15, 30 e 60 min de incubação com o veneno e irradiação (Fig. 7). O laser infravermelho demonstrou o mesmo perfil de efeito que o laser vermelho para os níveis de ATP intra e extracelular, com exceção do nível de ATP intracelular aos 15 min, que não mostrou diferença estatística em relação ao grupo veneno (Fig. 7D).



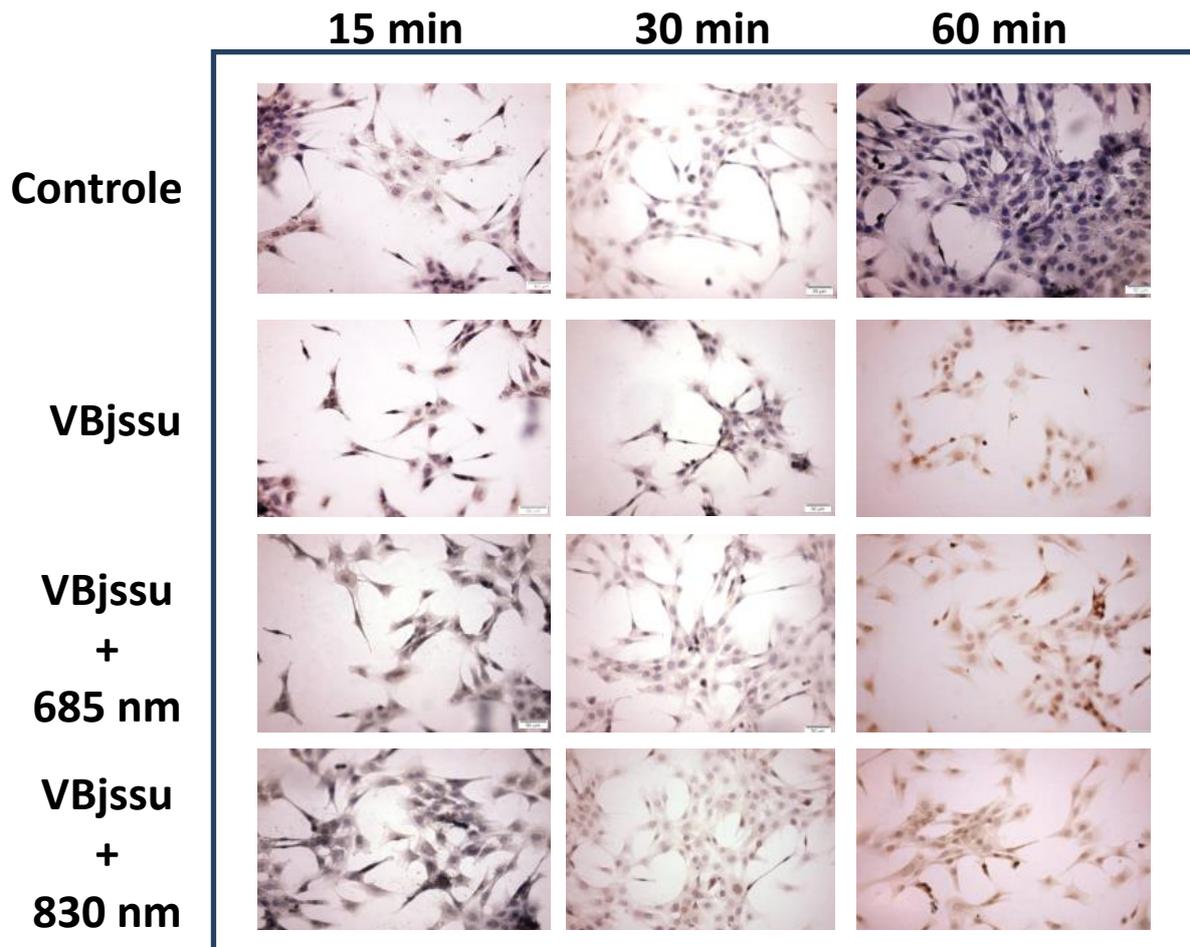
**Figura 7 - Efeito da FBM na quantidade de ATP intra e extracelular por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o laser (685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). A análise de ATP foi realizada no sobrenadante das células com o kit Perkin Elmer. \*p < 0.05 em relação ao grupo controle; #p < 0.05 em relação ao grupo veneno.

#### **4.6 O Efeito da FBM sobre a imunomarcagem de IL-6, IL-1 $\beta$ e IL-8 por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.**

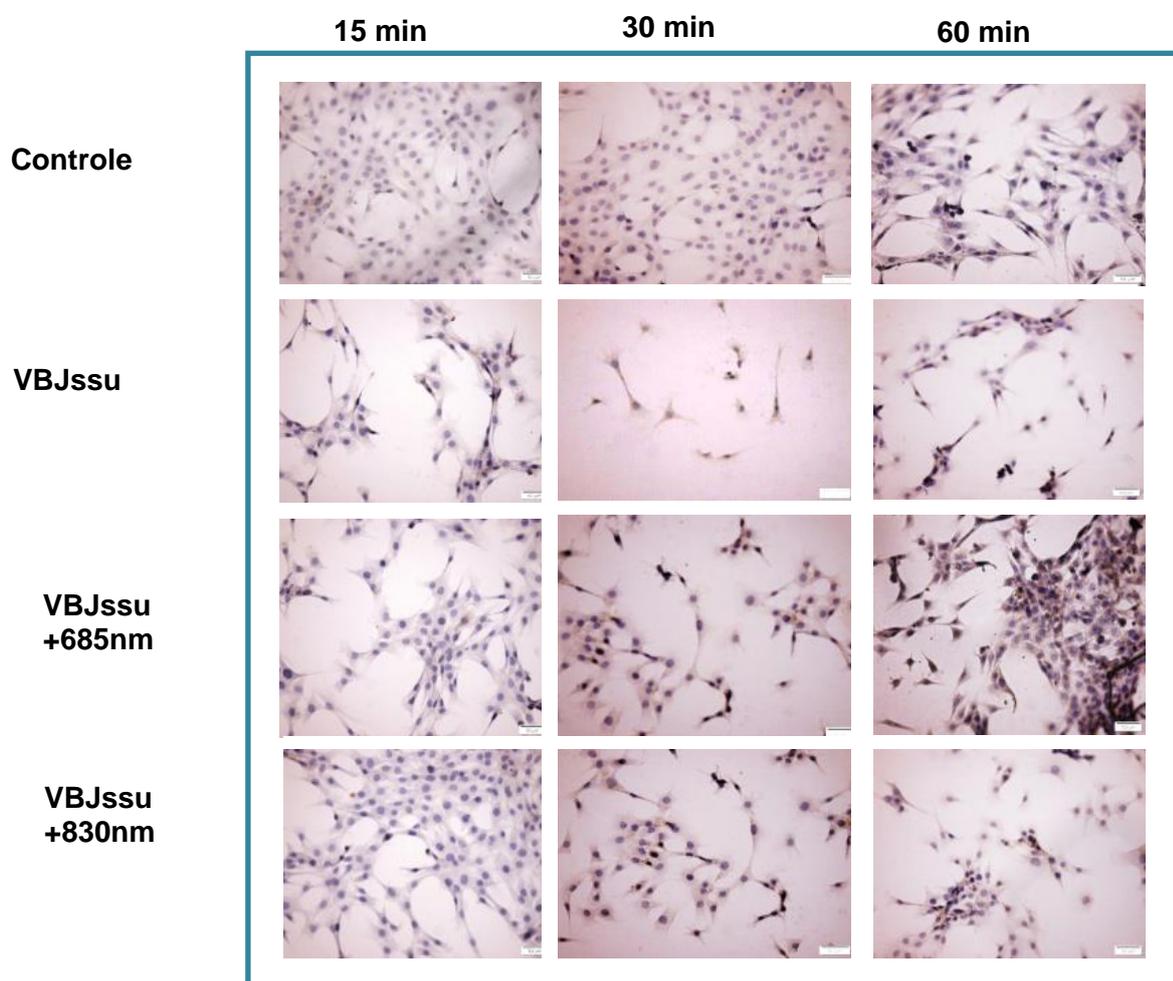
A Figura 8 demonstra a imunomarcagem para a interleucina IL-6 em células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu* e irradiadas com o laser 685 ou 830 nm. Podemos observar que houve uma marcação positiva para essa citocina no tempo de 60 min de incubação com o veneno. A irradiação com o laser não foi capaz de reduzir a expressão dessa citocina por nenhum dos comprimentos de onda estudados (Figura 8).

A Figura 9 demonstra a marcação para a interleucina IL-1 $\beta$  em células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu* e irradiadas com o laser 685 ou 830nm. O veneno de *B. jararacussu* causou um aumento da expressão dessa citocina no tempo de 30 e 60 min de incubação com o veneno, em relação ao controle. A irradiação com o laser foi capaz de reduzir a expressão dessa citocina pelos dois comprimentos de onda estudados (Figura 9).

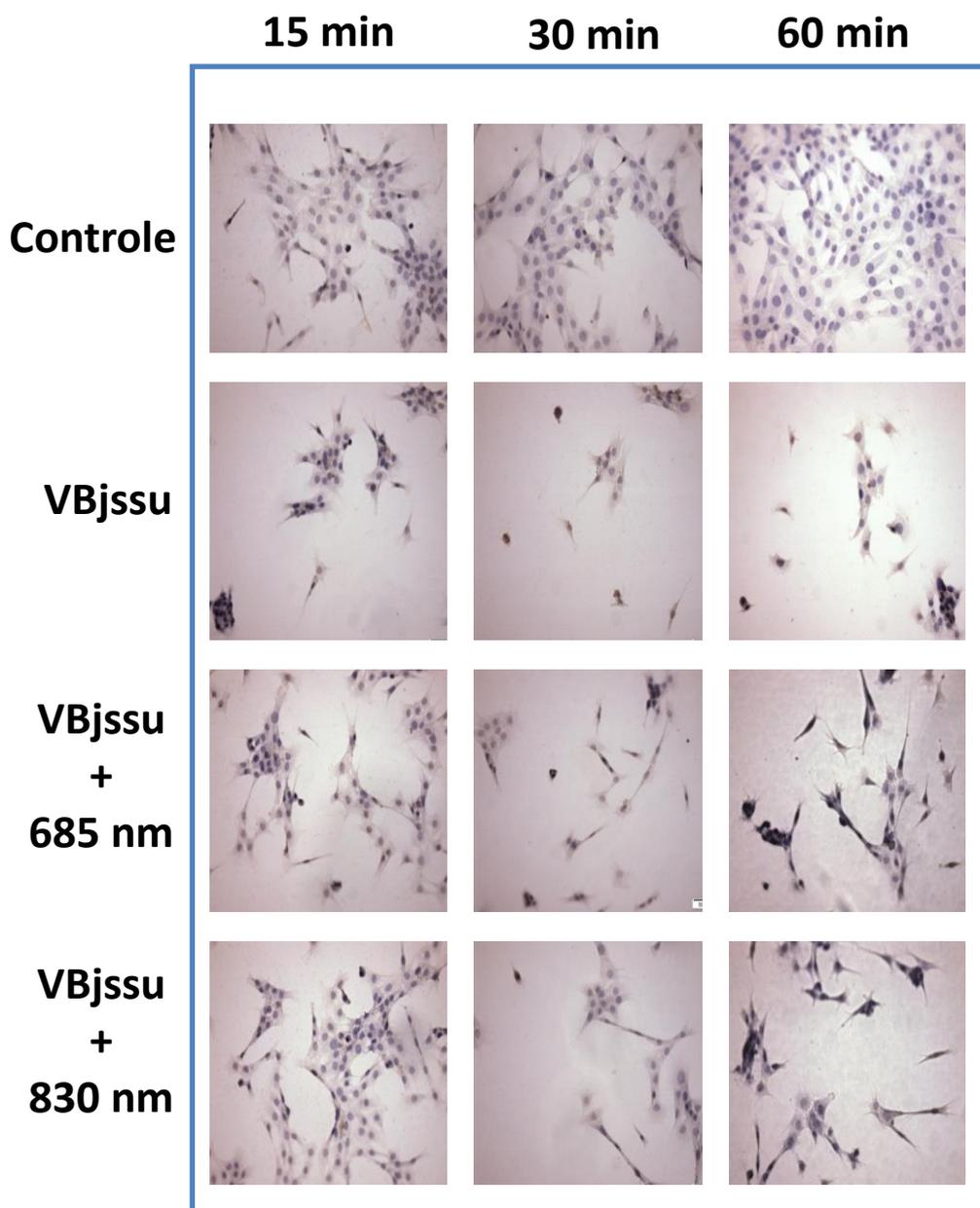
Ao analisarmos a expressão da citocina IL-8, observamos que o veneno de *B. jararacussu* não causou a expressão dessa citocina em células C2C12, em nenhum dos tempos estudados, observados na (Figura 10).



**Figura 8: Efeito da FBM sobre a imunexpressão de IL-6 por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* por 15, 30 ou 60 min e tratadas com o laser (685 ou 830nm) ou meio de cultura (controle). As células foram então incubadas com anticorpo específico para citocina IL-6.( fotos no aumento de 20x)



**Figura 9: Efeito da FBM sobre a expressão de IL-1 $\beta$  por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com veneno de *B. jararacussu* por 15', 30' e 60 minutos e tratadas com o LBP ( 685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). As células foram então incubadas com anticorpo específico para citocina IL-1 $\beta$ . (Fotos no aumento de 20x)



**Figura 10: Efeito da FBM sobre a expressão de IL-8 por células C2C12 incubadas com o veneno de *B. jararacussu*.** As células C2C12 foram incubadas com o veneno de *B. jararacussu* por 15', 30' e 60 min e tratadas com o LBP (685 ou 830 nm) ou meio de cultura (controle). As células foram então incubadas com anticorpo específico para citocina IL-8. (Fotos no aumento de 20x)

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a linhagem celular C2C12 de mioblastos, para examinar o efeito direto do veneno da *Bothrops jararacussu* em células musculares. O uso de células isoladas de mioblasto/miotubulos de músculo esquelético, como alvo para o veneno de serpente e suas toxinas tem sido sugerido ser uma alternativa viável em modelo *in vitro* para estudar mecanismos miotóxicos, uma vez que se correlacionam com a miotoxidade *in vivo* <sup>(40)</sup>

Apesar de alguns estudos demonstrarem a eficácia da FBM (Fotobiomodulação) sobre a reação local causada por venenos Botrópicos e seus benefícios <sup>(36-39-51)</sup>, pouco se sabe como a FBM é capaz de afetar os sistemas celulares envolvidos nos efeitos locais, particularmente na mionecrose, e quais são os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos. Neste trabalho utilizamos o laser de baixa potência na densidade de energia de 4,6 J/cm<sup>2</sup> em dois comprimentos de onda, um infravermelho 830 nm e outro no vermelho 685nm, aplicada sobre a monocamada celular, imediatamente após a incubação com o veneno. A dose do laser foi escolhida com base na literatura que mostra, que em cultura celular o laser possui um efeito benéfico tanto do laser vermelho quanto do infravermelho com doses entre 3 ou 5 J/cm<sup>2</sup> e uma dose maior que 16 J/cm<sup>2</sup> perderia o seu efeito benéfico, podendo tornar-se prejudicial.<sup>(55)</sup>

Neste estudo, o efeito do laser sobre a proliferação de células expostas ao veneno da *B. jararacussu* foi avaliada através do teste Alamar Blue, ensaio que também é muito utilizado para avaliar a citotoxicidade do meio. Onde as células incorporam a resazurina (composto colorimétrico de oxidação-redução) que atua como um aceitador intermediário de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV, este composto pode ser reduzido intracelularmente na presença de enzimas mitocondriais<sup>(56-57)</sup>. Os resultados demonstraram que o veneno se mostrou citotóxico para as células C2C12, no tempo de 30 e 60 min. Foi observado uma citoproteção através do aumento da proliferação celular nos grupos que foram tratados com o laser, em ambos os comprimentos de onda estudados. Diversos estudos têm demonstrado que o laser aumenta a proliferação de vários tipos celulares, tais como células tronco mesenquimais e células cardíacas,<sup>(58)</sup> células tronco da polpa dental humana <sup>(59)</sup> e fibroblastos gengivais humanos.<sup>(60)</sup> Não

obstante, permanece ainda obscuro qual mecanismo é decisivo para desencadear a cascata de sinalização que culminará com o incremento da proliferação celular. Vários mecanismos têm sido propostos, como, ativação da cadeia respiratória, aumento da produção de ATP, RNA e DNA. Entretanto, dependendo da dose utilizada e do estado fisiológico das células irradiadas alguns mecanismos prevalecem <sup>(61)</sup>

Em estudos *in vivo*, Dourado et. al.<sup>(38)</sup> e Barbosa et. al.<sup>(51)</sup> constataram que o laser no comprimento de onda 904nm e 685nm, com densidade de energia de 4,6 J/cm<sup>2</sup> e 4,2 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente, foram capazes de reduzir, significativamente, a mionecrose induzida por veneno botrópico, demonstrado em histologia e confirmado pela redução dos níveis de liberação de CK. O principal componente do veneno botrópico, que provoca dano nas células do músculo é a PLA2 miotóxica <sup>(42)</sup>. Tem sido demonstrado que a PLA2 miotóxica tem como alvo, o sarcolema, e induz uma degeneração aguda das fibras musculares esqueléticas. <sup>(49)</sup> No entanto, o mecanismo de miotoxicidade exercida pela PLA2 do veneno são ainda, parcialmente compreendido<sup>(52)</sup>. Gutierrez e Ownby<sup>(8)</sup> propuseram dois tipos principais de dano induzido pela PLA2 miotóxicas na membrana plasmática das células musculares: primeiro uma perturbação na integridade da bicamada por um mecanismo independente de hidrólise do fosfolípido, e a segunda uma ruptura da membrana com base na degradação enzimática do fosfolípido de membrana. Além disso, Cintra-Francichinelli et.al <sup>(62)</sup> demonstraram que miotoxinas isoladas do veneno de Bothrops promovem um rápido efluxo de K<sup>+</sup> e ATP para o meio extracelular, revela ser um mecanismo indireto do mecanismo de ATP através da qual o músculo é afetado.

É possível que no nosso modelo experimental, o laser tenha protegido o mioblasto por um mecanismo independente de hidrólise enzimática do fosfolípido de membrana. Está hipótese baseia-se no fato de que o laser é absorvido pelos componentes da cadeia respiratória que levam a alteração em ambos, na mitocôndrias e no citoplasma, iniciando assim uma cascata de sinalização intracelular que promove a citoproteção celular<sup>(11,23)</sup>. Para testar esta hipótese medimos a quantidade de níveis intra e extracelulares de ATP. Os nossos resultados mostraram que a irradiação com laser impediu a liberação de ATP no meio extracelular e aumentou os seus níveis intracelulares. Estes resultados fornecem a

primeira evidência de que a irradiação FBM pode modular a síntese de ATP após a exposição veneno. Tem sido demonstrado que miotoxinas isoladas a partir de veneno de *B. asper* induziu uma liberação de uma grande quantidade de K<sup>+</sup> e ATP a partir de músculo esquelético. Eles demonstram também que o ATP liberado, amplifica o efeito das miotoxinas, que se espalha e causa danos muito maior do que os causados diretamente pelas miotoxinas<sup>(39)</sup>.

Nossa hipótese é que o efeito biomodulador causado pela FBM em níveis de ATP poderia iniciar uma cascata de sinalização que promove a citoproteção celular observada em nosso estudo. Além disso, a diminuição da liberação de ATP extracelular, observada após irradiação com o FBM, também poderia aumentar os efeitos da irradiação reduzindo os efeitos nocivos locais provocadas pelo veneno, observados em estudos *in vivo*, tais como, redução de edema, da inflamação,<sup>(44)</sup> hiperalgesia<sup>(43)</sup> e até mesmo hemorragia.<sup>(44)</sup> Ainda, alguns estudos demonstraram que o ATP pode estimular a mitogênese de mamíferos pelo envolvimento de diferentes cascatas de sinalização.<sup>(63)</sup> Além disso, segundo Karu et.al,<sup>(61)</sup> a FBM promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), alteração no pH intracelular e das concentrações de cálcio, que podem ser parte dos caminhos da transdução de sinais das respostas biológicas induzidas pela luz do laser de baixa intensidade.

Após a lesão do músculo, as células satélites se tornam ativadas, dividem-se e diferenciam-se, o que leva a formação de novas miofibras ou a reparação de fibras já existentes.<sup>(53)</sup> Com a observação de que o laser protege as células C2C12 contra o veneno, verificamos se estas células seriam capazes de se diferenciar em miotubulos após a exposição, com o veneno e a irradiação com o laser em ambos os comprimentos de onda. Os resultados demonstraram que além da citoproteção celular, causada pela irradiação com o laser nos dois comprimentos de onda estudados, estas células também foram capazes de se diferenciar, verificado por células alongadas que caracterizam fusão entre as células, consistente com a morfologia típica de diferenciação celular em células musculares.<sup>(54)</sup> É interessante notar que após quatro dias não haviam células viáveis no grupo que foi administrado o veneno e, que não receberam a irradiação com o laser, o que confirmando o efeito citoprotetor celular causado pela fotobiomodulação, nos

grupos que foram tratados com o laser.

O processo de regulação para formar novos músculos envolve a ativação apropriada, proliferação e diferenciação de células miogênicas, que depende da expressão e ativação de fatores de transcrição conhecidos como fatores de regulação miogênicos. <sup>(64)</sup> Estudos têm mostrado que MyoD e Miogenina são fatores reguladores miogênicos de crescimento, considerados como marcadores de formação de músculos que podem regular a divisão de células satélites.<sup>(65)</sup> Além disso, MyoD e Miogenina regulam a expressão de genes necessários para a diferenciação terminal, tais como o da família de genes da cadeia pesada da miosina<sup>(65)</sup>. Em nosso modelo experimental, a diferenciação de miotubulos observados por histologia após a irradiação com o laser, foi acompanhada por um aumento dos fatores reguladores miogênicos MyoD e miogenina. Um achado importante encontrado, foi que a expressão de ambos MyoD e Miogenina, foi aumentado na fase inicial do miogênese pela FMB, o que pode ter contribuído para a promoção de regeneração de fibras musculares observados em estudos *in vivo*. Estes resultados corroboram os de Rodrigues et.al. <sup>(65)</sup> e Brunelli et.al.<sup>(66)</sup>, este demonstraram que o tratamento com o laser de baixa intensidade causou um aumento na expressão dos genes MyoD e miogenina, durante a cicatrização em um modelo experimental de criolesão em ratos. Dessa maneira, o presente resultado sugere que a irradiação com o laser foi capaz de modular a expressão de MyoD e miogenina em células C2C12. Tal evento provável estaria promovendo a modulação, desempenhando um papel relevante na proteção do músculo, após o envenenamento botrópico em resposta a FMB.

Em nosso modelo experimental, avaliamos a participação dos mioblastos/miotubos no processo inflamatório, induzido por venenos botrópicos através da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Verificamos que o veneno foi capaz de induzir a expressão da IL-6 em células C2C12, no entanto a FMB não foi capaz de impedir essa liberação. A literatura mostra que o laser é capaz de diminuir a liberação dessa citocina em modelos experimentais de artrite,<sup>(67-68)</sup> mas não foi capaz de modificar a expressão do gene IL-6 em modelo experimental de inflamação pulmonar,<sup>(69)</sup> e em nosso modelo tivemos um aumento da expressão da IL-6 mas o veneno não foi capaz de expressar as citocinas IL-1 $\beta$  e a IL-8 e essas discrepâncias

indicam que diferentes tipos de inflamação induzem diferentes tipos de resposta da FBM, ainda, a dosagem e tempo de aplicação do laser podem alterar as respostas biológicas.<sup>(70)</sup> Embora, ainda haja muitas perguntas a serem respondidas sobre os mecanismos pelos quais a FMB provoca efeitos protetores contra a mionecrose causada pelo veneno, o presente trabalho evidenciam, que a utilização da FMB poderia ser uma ferramenta terapêutica eficaz, associado com a soroterapia existente, no tratamento de picada de serpentes.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

- ✓ O veneno de *B. jararacussu* causou uma inibição da proliferação celular no grupo veneno no tempo de 30 e 60 minutos, contudo o FBM bloqueou a ação do veneno.
  
- ✓ O FBM foi capaz de induzir um aumento na expressão dos marcadores miogênicos, através da miogenina no tempo de 60 min e MyoD nos tempos 30 e 60 min, após a incubação com o veneno em ambos os comprimentos de onda estudados.
  
- ✓ A FBM causou um aumento de ATP intracelular e redução de ATP extracelular.
  
- ✓ O veneno de *B. jararacussu* causou um incremento na expressão da citocina IL-6. No entanto a FBM não foi capaz de reduzir essa expressão. Ademais, o veneno não causou aumento da expressão das citocinas IL-1 $\beta$  ou IL-8.

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo revela que a FBM, através do laser de baixa intensidade, causou um efeito protetor sobre mioblastos C2C12 após incubação com o veneno de *B. jararacussu*, tal proteção deve estar relacionada ao acréscimo dos níveis de ATP intracelulares. Além disso, a irradiação do laser foi capaz de promover a diferenciação de células C2C12, possivelmente, pelo aumento da expressão de fatores miogênicos MyoD e miogenina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Funasa Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes por Animais Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2ª Ed. 2001.
2. Barraviera, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. JBM, São Paulo, 1993; 65(4): 209-250.
3. Araújo, F.A.A., Santalúcia, M., Cabral, R.C., Epidemiologia dos animais peçonhentos. In. Cardoso, J.L.C. Faça, F.O.S., Wen, F. H. Maleque, C.M.S., Haddad, Jr. V. (Eds.), Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clinica terapêutica dos acidentes , Savier, São Paulo, 2003, pp.6-12.
4. Barravieira, B., & Ferreira Jr. Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu CEVAP : UNESP, vol. 1, p.9-52. 2007
5. Doin-Silva, R.; Baranauskas, V.; Rodrigues-Simioni, L.; da Cruz-Höfling, M.A. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. Photochem Photobiol. 2009 Jan-Feb;85(1):63-9.
6. Zamuner, S.R.; da Cruz-Höfling, M.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. Toxicon, 44: 259–71,2004.
7. Soares, A.M. et al ,Structural and functional analysis of Bmj Mip, a phospholipase A2, myotoxin inhibitor protein from Bothrops moojeni snake plasma, Biochemical and Biophysical Research Communication V302,p193-200, 2003
8. Gutierrez, J. M.;Ownby, C. L.; Odell, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and myotoxin of *Bothrops asper*. Exp. Molec. Pathol., 1984; 40: 367-379.

9. Pedersen, J.Z., Lomonte, B., Massoud, R., Gubensek, F., Gutierrez, J.M., Rufini, S. autocatalytic acylation of phospholipase- like. *Myotoxins Biochemistry*, vol 34. P. 4670-4675, 1995.
10. Queiroz, L.S. & Petta, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 1984; 26: 247-253.
11. Bjarnason, J. B. & Fox, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.*, 62: 325-372, 1994.
12. Ownby, C. L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: *Handbook of Toxinology*: 602-654. (W. T. Shier and D. Mebs, Eds). New York, Marcel Dekker, 1990.
13. Ohsaka, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *Hand. Exp. Pharmac.*, 52: 480-546, 1979.
14. Hati, R.; Mitra, P.; Sarker, S.; Bhattacharyya, K. K. Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(1): 1-19, 1999.
15. Gutiérrez, J. M. Rucavado, A Snake venom metalloproteinases their role in the pathogenesis of local tissue damage *Biochimie* V.82, p.841-850, 2000.
16. Chaves, F., Barbosa, M., Gutierrez, J. M., Pharmacological study of edema by venom of the snake *Bothrops asper*, in price, *Toxicon*, Oxford. V.33, p 31-39. 1995
17. Milani Junior, R. *et al.*, Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State. *Brazil. QJM*. 1997; 90(5): 323-334.
18. Flores, C. A.; Zappellini, A.; Prado-Franceschi, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, v.31, p. 1551-1559, 1993.

- 19.** Acosta de Pères, O. et al. Edema y mionecrosis inducidos por veneno de *Bothrops jararaca* de Argentina em ratones. *APPTLA*, v.46, p.233-238, 1996.
- 20.** Olivo, R. A. et al. Role of ciclooxigenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*, v.49, n.5, p.670-677, 2007.
- 21.** Zamuner, S. R.; Teixeira, C. F. P. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators inflammation*, v.11, p.351-357, 2002.
- 22.** Zamuner, S. R. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*, v.46, p. 806-813, 2005.
- 23.** Zamuner, S. R. et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions peritoneal leucocytes "in vivo". *Toxicon*, v. 39, p. 1505-1513, 2001.
- 24.** Lassar, A.B.; Skapek, S.X.; Novitch, B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol.*1994; 6:788-794.
- 25.** Sanchez, E. F.; Freitas, T. V.; Ferreira-Alves, D. L.; Velarde, D. T.; DINIZ, M. R.; Cordeiro, M. N.; Agostini-Cotta, G.; *et al.* Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 1992; 30(1):95-103.
- 26.** Homsí-Branderburgo, M. I.; Queiroz, L. S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussus* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*. 1988; 26 (7): 615-27.

- 27.** Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Prado Franceschi, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22, 339–346.
- 28.** Bischoff, R.; Heintz, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev. Dyn.* 1994; 201(1): 41-54.
- 29.** Dogra, C.; Hall, S.L.; Wedhas, N.; Linkhart, T.A.; Kumar, A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282: 1-16.
- 30.** Olson, E.N.; Perry, M.; Schulz, R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol.* 1995; 172:2–14.
- 31.** Megeney LA.; Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcriptional factors. *Biochem. Cell Biol.* 73(9-10): 723-32, 1995.
- 32.** Schumalbruch H.; Lewis D.M. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve* 23: 617-626, 2000
- 33.** Ishido M; Kami K; Masuhara M. In vivo expression pattern of MyoD, p21 and Rb protein in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 287, C404-C493, 2004.
- 34.** Yaffe, D; Saxel, D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977; 270:725-7.
- 35.** Lee, M.H.; Jang, M.H.; Kim, E.K.; Han, S.W.; Cho, S.Y.; Kim, C.J. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97(3):369-76.

- 36.** Georges, B.; Galland, S.; Rigault, C.; Le Borgne, F.; Demarquoy, J. Beneficial effects of L-carnitine in myoblastic C2C12 cells. Interaction with zidovudine. *BiochemPharmacol.* 2003; 65: 1483-1488.
- 37.** Camey, K. U.; Velarde, D. T.; Sanchez, E. F. Characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropicantivenom in Brazil. *Toxicon*, 2002; 40(5): 501-9.
- 38.** Dourado, D. M.; Baranauskas, V.; Cruz-Hofling, M. A. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by bothrops moojeni snake venom. *Lasers surg. med.*, 2003; 33: 352-357.
- 39.** Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B.; Sousa, L.G.; Munin, E.; Fernandez, C.M.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(4):591-7.
- 40.** Ludmila Guimarães Souza, Camila Squarzoni Dale, Nikele Nadur-Andrade, Ana Maria Barbosa, José Carlos Cogo, Stella Regina Zamuner. Low-level laser therapy reduce edema leukocyte influx and hyperalgesia induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Clin Exp Med Lett*, 52(3-4): 97-102, 2011.
- 41.** Dortbudak, O. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser *Clin. Oral Implants Res*; 16: 540–545 . 2000.
- 42.** Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS (1996) Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 107:593–596
- 43.** Nikele Nadur-Andrade, Stella R. Zamuner, Elaine F. Toniolo, Carlos J. de Lima, José Carlos Cogo and Camila S. Dale Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on Bothrops moojeni Venom-Induced Hyperalgesia. 2013.

44. Nadur-Andrade, N.; Barbosa, A.M.; Carlos, F.P.; Lima, C.J.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1):65-70.
45. Uchoa, L.R.D.A.; Dantas, M.E.; Lucena, K.C.R.; Catão, M.H.C.V.; Granville-Garcia, A.F.; Carvalho, N.L.G. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An. Bras. Dermatol.* 2010; 85(6): 849-855.
46. Stein, A.; Benayahu, D.; Maltz, L.; Oron, U. Lowlevel laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 2005, 23: 161–166.
47. Nakano, J.; Kataoka, H.; Sakamoto, J.; Origuchi, T.; Okita, M; Yoshimura, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 2009; 94(9):1005-15.
48. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23:492–496
49. Silva, C.A.A, Silva, L.M.G., Rocha, C.R., Oliveira, L.V.F., Mesquita-Ferrari, R.A., Cogo, J.C., Zamuner, S.R., Myotoxic effect of *bothrops jararacussu* snake venom on C2C12 muscle cells. *Clin Exp Med Lett*,53 (1-2): 7-10, 2012+.,
50. Barbosa, A.M; Villaverde, A.B; Guimarães-Sousa, L.; Soares, A.M; Zamuner, S.F.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom J. *Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2010; 16(3):470-479.
51. Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B; Guimarães-Souza, L.; Ribeiro, W.; Cogo, J.C.; Zamuner, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 2008; 1;51(7):1236-44.

- 52.** Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *PesquiOdontol Bras.* 2003;17:307-13.
- 53.** Silva EM, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanini AF. Avaliacaohistologica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrizacao de tecidos epitelial, conjuntivo e osseo: estudo experimental em ratos. *Ver Sul-Bras Odontol.* 2007;4:29-35
- 54.** Bourguignon AMF, Feitosa RCA, BeltraoGC, Pagnoncelli MR. Utilizacao do laser de baixa intensidade no processo de cicatrizacao tecidual. Revisao de literatura. *Ver Port Estomatol CirMaxilofac.* 2005; 46:37-43.
- 55.** Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 7:358–383
- 56.** Vega-Avila, E., and Pugsley, M.K. (2011) an overview of colorimetric, assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 54, 10-14.
- 57.** O'Brein, J. et al (2000) investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity . *European Journal of Biochemistry* 267-5421-5426.
- 58.** Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007;39(4):373-8
- 59.** Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(6):433-8.
- 60.** Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809nm diodo laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(5):365-9.

- 61.** Karu TI. Low-power laser therapy. In: Vo-Dinh T, editor. Biomedical photonics handbook. Boca Raton: CRC Press; 2003.
- 62.** Cintra- Francischimelli, M. Paola Caccin et al Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. Communicated by Rino 2010
- 63.** Greenberg, S. et al, Extracellular nucleotides mediate  $Ca^{2+}$  flux in J774 macrophages by two distinct mechanisms. J Biol Chem; 263 (21):10337-43,1998
- 64.** Ishido M; Kami K; Masuhara M. In vivo expression pattern of MyoD, p21 and Rb protein in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. Am J. Physiol. 287, C404-C493, 2004.
- 65.** Rodrigues, S. L. et al pharmacological evidence for a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops Neuwied* (jararaca pintada) Toxicon 43, 633-638, 2004
- 66.** Brunelli RM, Rodrigues NC, Ribeiro DA, Fernandes K, Magri A, Assis L, et al. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. Lasers Med Sci. 2014; 29(1): 91-96.
- 67.** Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U (2005) Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. Photomed Laser Surg 23:161–166
- 68.** Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, Messias Fde M, Lopes-Martins RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. Lasers Med Sci. 2012 10103-011-0906-1
- 69.** Carlos SP, Dias AS, Forgiarini Júnior LA, Patricio PD, Graciano T, Nesi RT, Valença S, Chiappa G.R., Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. J Bras Pneumol. 2014;40(4):411-20.

**70.** Silva CM, Leal MP, Brochetti RA, Braga T, Vitoretti LB, Câmara NOS, Damazo AS, Ligeiro-de-Oliveira AP, Chavantes MC, Lino-dos-Santos-Franco A. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. PLoS One. 2015; 10(11): e0142816.