

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

**Avaliação da eficácia do laser de baixa intensidade sobre
alterações induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops
jararaca* na microcirculação do músculo cremaster de
camundongos**

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

STRICTU SENSU EM MEDICINA

Avaliação da eficácia do laser de baixa intensidade sobre alterações induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* na microcirculação do músculo cremaster de camundongos

Dissertação apresentada a Universidade Nove de Julho – UNINOVE; como requisito à obtenção do título de Mestrado em Medicina.

Orientadora: Dra. Stella Regina Zamuner

Co-orientador: Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves

Aluna:

Ingrid Sestrem Linhares

Linhares, Ingrid Sestrem.

Avaliação da eficácia do laser de baixa intensidade sobre alterações induzidas pelo veneno da serpente Bothrops jararaca na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. / Ingrid Sestrem Linhares. 2016.

42 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Profa. Dra. Stella Regina Zamuner.

1. Microcirculação. 2. Bothrops jararaca. 3. Microscopia intravital. 4. Inflamação. 5. Laser de baixa intensidade.

I. Zamuner, Stella Regina. II. Título.

CDU 616

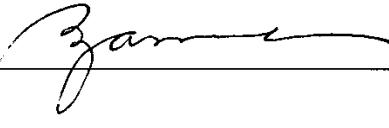
São Paulo, 08 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

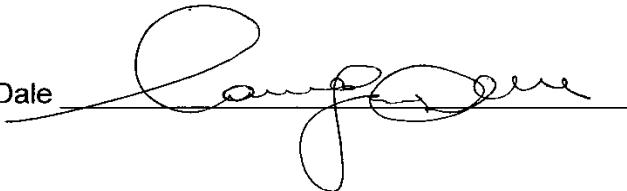
Aluna: **Ingrid Sestrem Linhares**

Título da Dissertação: “**Avaliação da eficácia do laser de baixa intensidade sobre alterações induzidas pelo veneno de Bothrops Jararaca na microcirculação do músculo cremaster de camundongos**”

Presidente: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner



Membro: Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale



Membro: Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni



Dedico esse trabalho

**A minha mãe Raquel Sestrem Linhares
e a minha irmã Ilze Beatriz Sestrem Linhares**

Obrigada pelo amor e apoio constante para minha formação

Amo muito vocês

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus,

A minha família,

A UNINOVE que me proporcionou a bolsa integral no curso de pós graduação de mestrado em Medicina

A minha orientadora Dra Stella Regina Zamuner, que foi fundamental nessa conquista, pelo carinho, paciência, atenção, experiência e dedicação em me ensinar sempre. Obrigada por me encaminhar para realizar os experimentos no Instituto Butantan, foi uma realização pessoal científica. Fiquei muito feliz de realizar meu projeto de pesquisa lá.

Ao meu co-orientador Dr Luis Roberto de Camargo Gonçalves, que com a convivência científica me proporcionou um aprimoramento a cada dia no Instituto Butantan, obrigada pela atenção e dedicação.

Ao meu professor da Uninove Dr Humberto Dellê, que na pós graduação em Análises Clínicas me orientou com o tema “medicamentos produzidos a partir de veneno” e me encaminhou a procurar e conhecer a professora Stella Regina Zamuner, obrigada professor pela atenção e conhecimento

Ao meu professor Dr João Piva Crema, pela orientação no curso de licenciatura em Ciências Biológicas sobre o estudo das toxinas de animais peçonhentos, obrigada pela atenção e conhecimento.

A professora Dra Solange Castanheira dos Anjos, com a qual fiz minha iniciação científica em 2001 sobre Aranhas venenosas no Brasil , obrigada pela amizade, atenção, dedicação e por me despertar o entusiasmo para o curso de bacharelado após a licenciatura, você fez parte dessa caminhada de conhecimento, e me ensinou a continuar a “trilhar”.

A Maria Beatriz Bernardez Amorim que esteve ao meu lado na realização dos experimentos no Instituto Butantan, aprendi muito com você.

A Aline da Silva, do grupo de pesquisa da Uninove pela amizade e companheirismo.

A todos os meus colegas da Uninove pelas conversas científicas

A Andreia Roberto Miyasaki da secretaria do programa de pós graduação em Medicina da Uninove, obrigada pela atenção, ajuda e carinho.

A todos aqueles que são e foram meus alunos, tenho muita satisfação em transmitir o que aprendo, vocês são minha fonte de inspiração constante.

A todos os meus amigos que me proporcionaram momentos de descontração e conversas incentivadoras

A Sueli e S. Umbelino Aguiar, diretores da escola em que trabalho, obrigada pela compreensão nas nossas conversas durante todo o meu período de mestrado.

Aprendi com todos e vou guardar esse momento para sempre,

Muito obrigada!!!

RESUMO

A reação local é uma consequência comum nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, que dependendo da extensão, pode determinar a perda do membro afetado. A soroterapia, que é o tratamento utilizado no caso de acidentes com serpentes desse gênero é pouco eficaz em neutralizar os efeitos locais causados por esses venenos. Portanto, evidencia-se a importância da procura de terapias coadjuvantes à soroterapia na evolução do quadro local. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre alterações induzidas pelo veneno de *B. jararaca* (VBj) na microcirculação de camundongos. Para isso, os animais foram anestesiados e o veneno de VBj foi aplicado topicalmente ($1 \mu\text{g}/20\mu\text{L}$) no músculo cremaster e avaliado nos tempos de 10, 20 e 30 min ou injetado ($1 \mu\text{g}/100\mu\text{L}$) por via subcutânea no músculo cremaster e avaliadas em 2 ou 24 h após a aplicação do veneno e o tratamento com LBI. Foram avaliadas as alterações nos diâmetros dos vasos, além dos parâmetros de interações leucócito-endotélio. O LBI foi utilizado no comprimento de onda de 685 nm, densidade de energia de 7 J/cm^2 , Potência de 35 mW com tempo de irradiação de 60 seg e área de $0,3 \text{ cm}^2$. Os resultados demonstraram que nos animais em que o veneno foi aplicado topicalmente e irradiados com LBI houve diminuição do rolamento de células similares aos do grupo de controle não envenenado. No grupo que a injeção de VBj foi aplicada na microcirculação e analisada 2 horas após, a irradiação com o LBI causou diminuição significativa desses leucócitos em rolamento, adesão e transmigração. Para avaliar a reatividade vascular, o VBj foi aplicado topicalmente e causou vasodilatação nas vênulas pós-capilares, no grupo em que o laser foi irradiado imediatamente após a aplicação do veneno, observamos vasoconstrição das vênulas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o LBI, nos parâmetros utilizados, apresentou efeito anti-inflamatório por reduzir a interação leucócitos-endotélio, possivelmente interferindo na ativação de moléculas de adesão responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias.

Palavras chaves: microcirculação, *Bothrops jararaca*, microscopia intravital, inflamação, laser de baixa intensidade.

ABSTRACT

The local reaction is a common characteristic of envenoming caused by *Bothrops* snakes, which depending on the extent can determine the loss of the affected limb. The antivenom therapy, which is the treatment used in the case of *Bothrops* snakes accidents, does not effectively neutralize the local effects caused by these venoms. Thus, it is important to search for adjuvant therapies to antivenom treatment in the evolution of the local effect. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of low level laser (LLL) on alterations induced by *B. jararaca* venom (Bjv) on mice microcirculation. For this, the animals were anesthetized and Bjv was applied topically (1 µg/20 µL) on cremaster muscle and evaluated for 10, 20 and 30 min or injected (1 µg/100 µL) subcutaneously into the cremaster muscle and evaluated at 2 or 24 h after the application of Bjv and treatment with LLL. Changes in vessel diameters were evaluated in addition to the parameters of leukocyte-endothelium interactions. The laser was applied at a wavelength of 685 nm, energy density of 7 J/cm², 35 mW power with irradiation time of 60 sec and area of 0.3 cm². The results showed that in the animals in which the venom was applied topically and irradiated with LBI there was a decrease in leukocyte rolling, similar to those in the non-envenomed control group. In the group that the injection of VBj was applied in the microcirculation and analyzed 2 hours later, the irradiation with the LBI caused a significant decrease of these leukocytes in rolling, adhesion and transmigration. To assess vascular reactivity, Bjv was applied topically and caused vasodilation in post-capillary venules, in the group in which the laser was irradiated immediately after the application of Bjv, we observed vasoconstriction of the venules. The results obtained in this work demonstrate that LLL, in the parameters used, presented anti-inflammatory effect by reducing the leukocyte-endothelium interaction, possibly interfering in the activation of adhesion molecules responsible for the recruitment of inflammatory cells.

Key words: microcirculation, *Bothrops jararaca* venom, intravital microscopy, inflammation, low-intensity laser.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Série histórica de acidentes e óbitos por animais peçonhentos	01
Figura 2	Edema, bolhas, dermonecrose e sangramento	03
Figura 3	<i>Bothrops jararaca</i>	04
Figura 4	Distribuição Geográfica da <i>Bothrops jararaca</i>	04
Figura 5	Irradiação do laser de baixa potência em uma célula	07
Figura 6	Migração leucocitária – Rolamento, adesão e transmigração	09
Figura 7	Planejamento Experimental	13
Figura 8	Vênula pós-capilar em microscopia intravital	14
Figura 9	Microcirculação de vaso medindo 100 µm	15
Figura 10	Células em rolamento na interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj) e irradiadas com LBI antes da aplicação do veneno	17
Figura 11	Células aderidas em interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj) e irradiadas com LBI antes da aplicação do veneno.	18
Figura 12	Células em rolamento na interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj) e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno.	20
Figura 13	Células aderidas em interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj) e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno	21
Figura 14	Células na interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (VBj) e irradiadas	23

com LBI imediatamente a aplicação do veneno

Figura 15 Células na interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares 25
na microcirculação do músculo cremaster de camundongos
induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas
com LBI imediatamente a aplicação do veneno

Figura 16 Diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremaster de 27
camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj)
e imediatamente irradiadas com o LBI

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA- análise de variância

AP-1- proteína ativadora 1

ATP- adenosina trifosfato

BBS-bicarbonate buffered saline

BthTX I- Bothropstoxina I

BthTX II- Bothropstoxina II

Bjv- *Bothrops jararaca* venom

Ca- Cálcio

cAMP- adenosina monofosfato ciclica

CD11a- Integrina -Antigênio 1 associado à função linfocitária

CD11b- Integrina de adesão de leucócitos

CD11c- Integrina alpha X

CD18- Integrina beta-2

CD62P- P selectina

CD62E- E selectina

CK- creatinoquinase

COX₂- Ciclooxygenase-2

DNA –Ácido desoxirribonucleico

DE- densidade de energia

FBM – Fotobiomodulação

HIF-1 α - Hypoxia-inducible factor 1-alpha

ICAM 1- Molécula de adesão intercelular 1

ICAM 2- Molécula de adesão intercelular 2

ICAM 3- Molécula de adesão intercelular 3

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 - Interleucina 1

IL-6-Interleucina 6

IFN- α - Interferon α

IFN- γ Interferony

J/cm²- joules por centímetro ao quadrado

K- Potássio

LBI- Laser de baixa intensidade
LEDs- Light Emitting Diode
LECAM – Molécula de adesão endotelial leucocitária – L-selectina
LFA1- Antígeno associado à função linfocitária
LIL- Low Intensity Laser
LLLT- Low Level Laser Therapy
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
mW- milivolts
NF-KB- factor nuclear kappa B
 μ g- microgramas
 μ l- microlitros
nm- nanômetros
NO- Óxido nítrico
TNF- α Fator de necrose tumoral- α
PLA₂-fosfolipases A₂
PBS-Phosphate buffered saline
PH- potencial Hidrogeniônico
PECAM 1- molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PGE₂- protaglandina E₂
Ref-1- Fator redox-1
RNA- ácido ribonucleico
ROS-Reacões oxidativas de oxigênio
VBa- Veneno de *Bothrops asper*
VBj- Veneno de *Bothrops jararaca*
VCAM 1- molécula de adesão da célula vascular 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Veneno Botrópico	2
1.2. Sinais e sintomas do envenenamento botrópico	2
1.3. <i>Bothrops jararaca</i>	4
1.4. Soroterapia	5
1.5. Terapia com laser de baixa Intensidade (LBI)	6
1.6. LBI e acidentes ofídicos	8
1.7. Migração Leucocitária	8
2. OBJETIVO	11
2.1. Objetivos Geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Veneno.....	12
3.3. Planejamento experimental.....	12
3.4. Interação Leucócito-Endotélio	13
3.5. Reatividade vascular.....	14
3.6. Irradiação com o Laser de baixa intensidade (LBI)	15
3.7. Análise Estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1 Efeito do laser de baixa intensidade sobre o rolamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de <i>B. jararaca</i> (VBj).....	16
4.2 Efeito do laser de baixa intensidade sobre a adesão de células inflamatórias induzidos pelo veneno de <i>B. jararaca</i> (VBj).....	18
4.3. Efeito do laser de baixa intensidade sobre o rolamento de células inflamatórias induzidos pelo VBj.....	19
4.4. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a adesão de células inflamatórias induzidos pelo VBj.....	21
4.5. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de <i>B. jararaca</i> (VBj) e tratados com o laser de baixa intensidade (LBI), após 2 horas.	22

4.6. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de <i>B. jararaca</i> (VBj) e tratados com o laser de baixa intensidade (LBI), após 24 horas	24
4.7. Efeito do LBI sobre a reatividade vascular após a aplicação tópica do veneno de <i>B. jararaca</i> (VBj).	26
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
Khadra, M; Kasem, N; Haanaes, H.R; Ellingsen, J.E; Lyngstadaas, S.P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(6):693-700.	37
8. ANEXO	42

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem, ainda, um problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo. No Brasil, os acidentes causados por animais peçonhentos bem como o número de óbitos por esses envenenamentos tem aumentado ao longo dos anos, sendo os acidentes causados por serpentes o que causam o maior número de óbitos (Fig. 1).

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 (BARRAVIERA, 1993). 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 (Manual de diagnóstico e tratamentos de acidentes por animais peçonhentos, 2001).

Série histórica de acidentes e óbitos por animais peçonhentos, Brasil. 1990-2010*

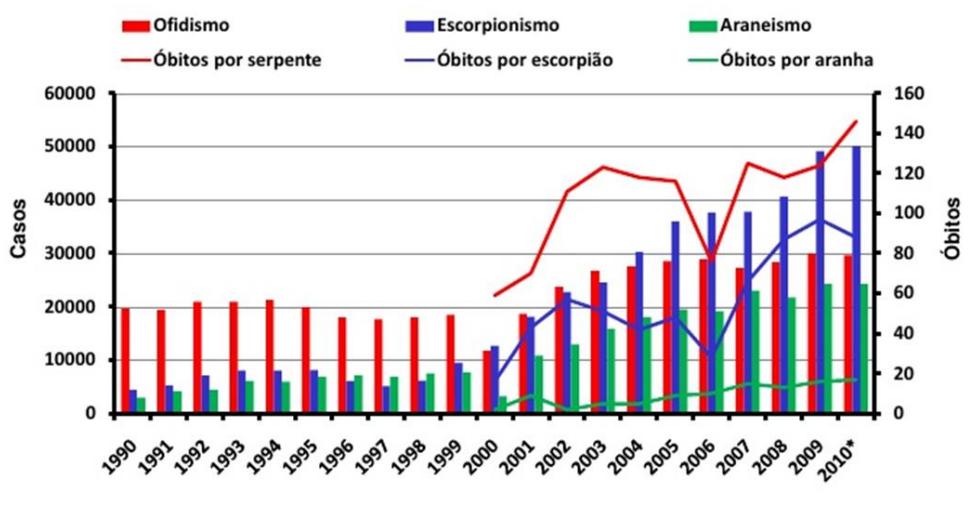


Figura 1. Secretaria de Vigilância em Saúde SINAN/SVS/MS

1.1. Veneno Botrópico

Os venenos ofídicos constituem uma mistura complexa de proteínas e outros compostos, com as mais diversas propriedades biológicas. Dessa forma, acredita-se que os seus efeitos resultem da somatória dos efeitos isolados dos vários componentes, com atividades biológicas distintas ou sinérgicas (TAKEYA et al., 1990).

A peçonha botrópica é, provavelmente, de composição mais complexa dentre as de outros gêneros. O seu conteúdo é composto por vinte ou mais componentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituido por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não tóxicas. Os componentes enzimáticos são as fosfolipases, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases e enzimas proteolíticas (BIEBER, 1979; BJARNASON, FOX, 1994). O componente não proteíco do veneno botrópico desempenha papel coadjuvante na ação enzimática, sendo pouco expressivo em quantidade e menos ativo biologicamente. Dentre os constituintes inorgânicos estão os metais, alguns metais atuam como co-fatores para diferentes atividades biológicas e enzimáticas e na constituição de metaloproteínas (BIEBER, 1979).

1.2. Sinais e sintomas do envenenamento botrópico

Segundo Rosenfeld (1971), o envenenamento botrópico pode ser classificado em sistêmico e local, considerando os sinais e sintomas predominantemente relatados nos acidentes ofídicos.

As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por alterações na homeostasia, caracterizados por deficiência da coagulação, da agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (HATI et al., 1999).

Os venenos botrópicos apresentam a importante peculiaridade de induzir sérias reações locais (Fig. 2). Observa-se no local da picada dor forte, presença de exudato purulento, edema intenso, equimose com material sero-sanguinolento e mionecrose (BOLAÑOS, 1982 ; ROSENFIELD, 1971). O edema pode acometer vários segmentos do membro afetado e, dependendo das proporções que adquire, acarreta aumento da pressão sanguínea, em compartimentos que contém músculos, nervos e vasos, levando a síndrome compartimental. O quadro pode evoluir para necrose e, muitas vezes, determinar a perda do membro afetado (ROSENFIELD, 1971).



Figura 2: Edema, bolhas, dermonecrose e sangramento-
Foto: Dr Claudio Machado -Hospital Vital Brasil

Os dados da literatura sugerem que a hemorragia causada pelos venenos botrópicos resulta da ação de metaloproteases, que contém zinco, de peso molecular relativamente alto, as quais parecem atuar diretamente na membrana basal do endotélio vascular (OHSAKA et al., 1973).

A mionecrose local é uma consequência comum dos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* (QUEIROZ et al., 1985; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). A literatura indica que a mionecrose é causada por uma família de proteínas denominadas miotoxinas, as quais possuem características de fosfolipases A2 e atuam diretamente sobre a membrana da célula muscular, por se ligarem e alterarem a membrana plasmática (GUTIÉRREZ & CERDAS, 1984). Essas miotoxinas induzem dano tecidual proeminente, de forma que as alterações morfológicas são observadas a partir de 15 minutos de sua injeção (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). A miotoxicidade pode, ainda, ser consequência da isquemia dos vasos da microcirculação e de artérias intramusculares (GUTIÉRREZ & CERDAS, 1984; QUEIROZ & PETTA, 1984). Acredita-se que por afetarem drasticamente a microvasculatura, essas toxinas impedem a irrigação adequada de sangue, necessária para o processo de regeneração (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Além das manifestações locais acima, o envenenamento botrópico é frequentemente associado ao processo inflamatório local (FLORES et al, 1993; BURIGO et al, 1996; FARSKY et al, 1997; ZAMUNER et al, 2001). Dados da literatura mostram que o envenenamento botrópico leva a formação de exsudato purulento no local da picada. Em modelos experimentais, o acúmulo de leucócitos foi

identificado no tecido muscular (LOMONTE et al., 2004), cavidade peritoneal (ZAMUNER et al., 2001) e pulmões (SILVEIRA et al., 2004). Ademais, o componente leucocitário, da reação inflamatória induzida pelos venenos de *B. jararaca* e *B. asper* foi caracterizado por ZAMUNER et al., (2001).

1.3. *Bothrops jararaca*

A serpente *Bothrops jararaca* (Fig. 3) apresenta porte médio, podendo atingir até 1,5 m, com presença de escamas superiores fortemente quinhadas e são encontradas em todo o Brasil e também nas regiões adjacentes ao Paraguai e Argentina (BARRAVIERA, 1993) (Fig. 4).



Figura 3. *Bothrops jararaca* Foto: Enio Branco

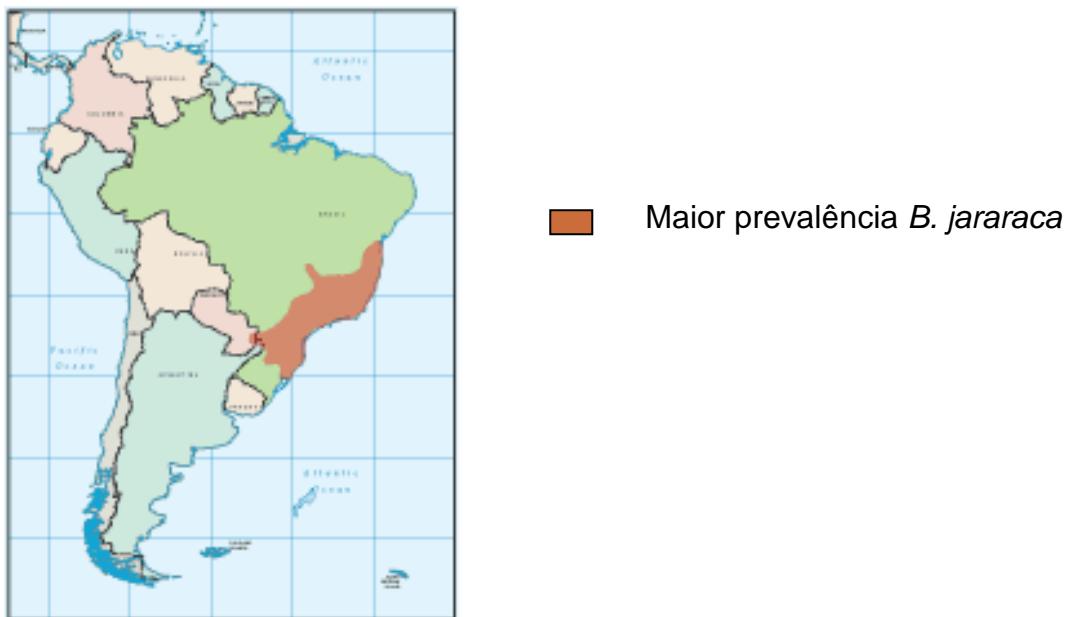


Figura 4. Distribuição geográfica da *B. jararaca*

Extraída de: www.cobrasbrasileiras.com.br

O veneno da serpente *B. jararaca* consiste de uma mistura complexa de várias classes de toxinas, sendo que a maior parte constitui-se de metaloproteinases (MOURA-DA-SILVA, et al., 2012). Diferentemente de outros venenos botrópicos, o veneno de *B. jararaca* apresenta concentrações muito baixas de fosfolipase A₂ e/ou miotoxinas (MOURA DA SILVA et al, 2012). Outra classe de protease presente no veneno de *B. jararaca* são as serinoproteases, as quais são capazes de induzir a liberação de bradicinina.

Nesse sentido, a espécie *Bothrops jararaca* possui um veneno com maior atividade proteolítica em comparação aos demais venenos botrópicos, sendo demonstrado por estudos que a hemorragia consiste na maior atividade tóxica do VBj (NISHIJIMA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2005; MOURA-DA-SILVA, et al., 2012).

O veneno de *Bothrops jararaca* causa uma intensa reação no local da picada, caracterizado por edema intenso, infiltrado leucocitário de acometimento rápido e mionecrose. O recrutamento leucocitário acarretado pelo veneno de *B. jararaca* foi relacionado a expressão de moléculas de adesão LECAM-1, LFA-1, ICAM-1 e PECAM-1, moléculas de adesão responsáveis pelos eventos de rolamento, firme adesão e transmigração associados ao recrutamento leucocitário (ZAMUNER & TEIXEIRA., 2002). Ainda, a migração de leucócitos induzido pelo veneno de *B. jararaca* é acompanhada da liberação de mediadores inflamatórios tais como as citocinas interleucina-6, TNF- α e interferon-gama (ZAMUNER et al, 2001; ZAMUNER & TEIXEIRA, 2002), bem como os mediadores lipídicos prostaglandina E2, tronboxana A2 e leucotrieno B4 (ZAMUNER & TEIXEIRA, 2002; ZAMUNER et al., 2005). Além disso, Zamuner et al., (2001) mostraram que o veneno de *B. jararaca*, além de causar a migração de células inflamatórias, é capaz de ativar várias funções microbicidas nestas células, como fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A literatura demonstra que o principal componente do veneno de *B. jararaca* responsável por causar inflamação são as metaloproteases contidas nesse veneno (ZYCHAR et al., 2010).

1.4. 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 (CARDOSO et al, 1993). A este respeito, qualquer atraso entre a picada e o início de soroterapia é crucial para um prognóstico crítico destes envenenamentos.

As lesões desencadeadas pelos venenos botrópicos evoluem rapidamente devido à rápida liberação de mediadores endógenos dos tecidos lesados que afetam a homeostasia do organismo (GONÇALVES e MARIANO, 2000). Assim, o soro neutraliza o veneno circulante, mas não os mediadores inflamatórios liberados no tecido lesado ou as lesões já estabelecidas (ROSENFIELD, 1971). Por esse motivo, 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 (FBM) utilizando o laser de baixa intensidade (LBI) e o diodo emissor de luz (LED) (DOIN-SILVA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; SOUZA et al., 2011; DOURADO et al., 2003; BARBOSA et al., 2008; NADUR-ANDRADE et al., 2012). Nosso grupo de pesquisa e outros têm relatado sobre os benefícios da FBM no efeito local induzido por veneno botrópico. Neste sentido, estudos efetuados com o LBI mostraram uma diminuição da mionecrose (DOIN-SILVA et al., 2009; BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; DOURADO et al., 2003), inflamação (BARBOSA et al., 2008; NADUR-ANDRADE et al., 2012), dor (SOUZA et al., 2011; NADUR-ANDRADE et al., 2012, 2016) e hemorragia (NADUR-ANDRADE et al., 2012) após a injeção de diferentes espécies de veneno botrópico, *in vivo*.

1.5. Terapia com laser de baixa Intensidade (LBI)

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” (UCHOA et al., 2010). A ação do laser consiste na absorção da luz pelos tecidos, resultando em modificações no metabolismo celular. A luz é inicialmente absorvida pelo cromóforo mitocondrial (citocromo c oxidase) e provoca aumento da produção de ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que por sua vez causam alterações no potencial redox celular, Ca₂₊, K+, cAMP e pH e induzem vários fatores de transcrição (Ref-1, AP-1, NFkB, HIF-1α). A cadeia de transdução e de amplificação do fotosinal induzida pela luz conduz a um aumento da proliferação

celular (estimulação da síntese de DNA e RNA), motilidade celular, produção de fatores de crescimento e acumulação de matrizes extracelulares (GUPTA et al., 2013; STEIN et al., 2005) (Fig. 5).

Os níveis de cálcio, fósforo e proteína são determinados por espectrometria de absorção atômica, colorimetria e fotometria, respectivamente (DE FREITAS E HAMBLIM, 2016) Acredita-se que o cálcio adicional transportado para o citoplasma desencadeie a mitose (MAAWAN KHADRA, 2004)

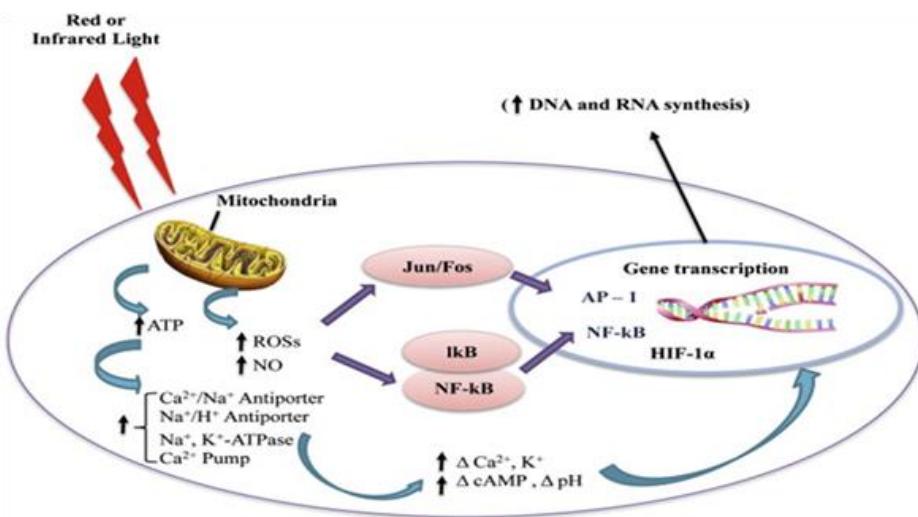


Figura 5: Irradiação do laser de baixa potência em uma célula- Gupta et al., 2013

Vários estudos demonstram que o LBI diminui a migração de células para o foco de lesão. Neste sentido, foi demonstrado que o laser diminuiu o recrutamento leucocitário em modelos experimentais de artrite (CARLOS et al., 2014), inflamação pulmonar (MAFRA DE LIMA et al., 2010), pleurisia (BOSCHI et al., 2008), queimadura de terceiro grau (FIORIO et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que o laser além de diminuir a migração de leucócitos, como exposto acima, ainda reduz significativamente a expressão e liberação de mediadores pró-inflamatórios como o IL-1 β , IL-6 e IFN- α (ALBERTINI et al 2008; CARLOS et al., 2014) que estão envolvidos na interação leucócito-endotélio, agindo nas células aderidas e estimulando-as a migrar para o gradiente quimiotático (KUMAR et al., 2005). Embora diferentes estudos tenham mostrado a eficácia da FBM na diminuição de células inflamatórias e dos mediadores envolvidos no recrutamento leucocitário o mecanismo pelo qual a FBM exerce esse efeito, não é conhecido.

1.6. LBI e acidentes ofídicos

Estudos do nosso grupo demonstraram uma redução significativa da mionecrose induzida por veneno de *B. jararacussu* e das miotoxinas BthTX- I e II após tratamento utilizando LBI, esse efeito do LBI 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 ou miotoxinas (BARBOSA et al., 2009; 2010). Esses dados corroboram os de Dourado et al., (2003) que demonstraram uma diminuição considerável da mionecrose induzida pelo veneno de serpente *B. moojeni*, após tratamento com o LBI, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana plasmática. Ademais, Doin-Silva, et al. (2009), observaram que o tratamento com o LBI causou uma melhora da transmissão neuromuscular e uma redução do desenvolvimento de mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararacussu* na preparação de nervo-músculo *in situ*. Ainda, nosso grupo demonstrou a eficácia do LBI na diminuição da resposta inflamatória local e hemorragia após lesão por veneno de *B. jararacussu* (BARBOSA et al., 2008) e *B. moojeni* (NADUR-ANDRADE et al., 2012) no qual os camundongos foram submetidos ao LBI combinado com antiveneno e foi observada uma diminuição da migração leucocitária e redução do edema.

Os dados apresentados acima sugerem que a FBM possa ser uma ferramenta promissora para minimizar a gravidade dos efeitos locais do envenenamento botrópico.

1.7. Migração Leucocitária

As células envolvidas no processo inflamatório são representadas, primordialmente, por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) que migram para o tecido adjacente. Os leucócitos mobilizados a partir dos compartimentos de reserva e da corrente sanguínea, marginam a superfície dos vasos da microcirculação da área que circunda a lesão, passam a deslizar sobre o endotélio, comportamento chamado de “rolling” e, posteriormente aderem à parede do vaso. A seguir essas células migram para fora do vaso, através de junções interendoteliais (diapedese), locomovem-se de modo orientado no sítio extravascular, em resposta a um gradiente de concentração de

mediadores inflamatórios (quimiocinas) e acumulam-se no local de lesão (FLOREY, 1970).

O fenômeno de migração leucocitária depende da expressão de moléculas de adesão na membrana de leucócitos e das células endoteliais. Várias famílias de moléculas de adesão foram caracterizadas e classificadas de acordo com suas propriedades bioquímicas e bases moleculares. Três dessas famílias participam da migração leucocitária: a das selectinas, a das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (VESTWEBER, 2007) (Fig. 6)

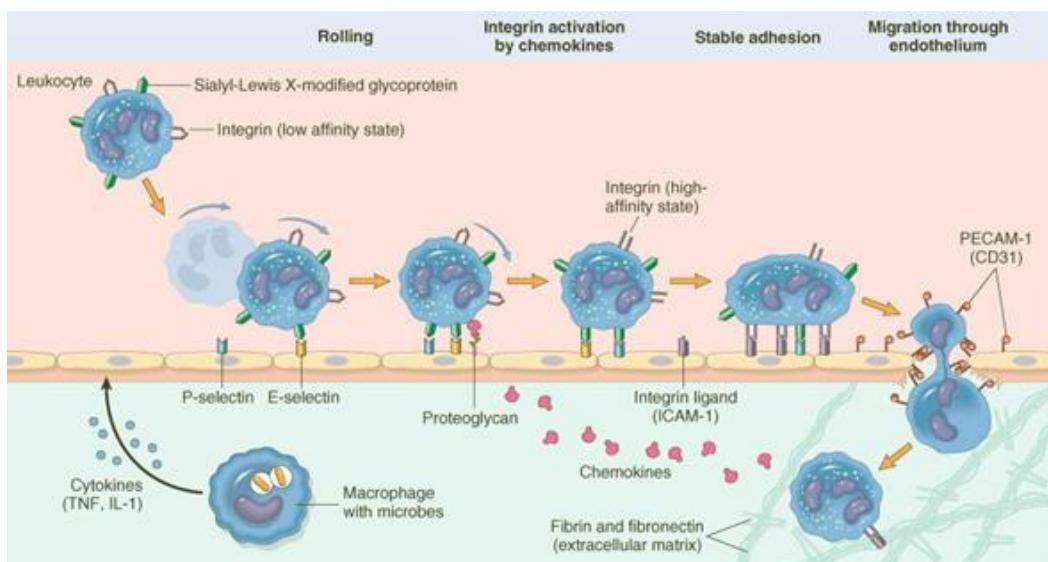


Figura 6: Migração leucocitária – Rolamento, adesão e transmigração -Robbins e Cotran, 2008

As selectinas compreendem uma família de moléculas semelhantes à lectina; são expressas tanto por leucócitos quanto pelo endotélio e modulam, principalmente, o comportamento “rolling” dos leucócitos. Três moléculas principais fazem parte desta família e são denominadas de P, E e L-selectinas (NEWTON e DIXIT, 2012). A P-selectina (CD62P) está envolvida nos eventos iniciais de adesão dos leucócitos e encontra-se estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade em células endoteliais e nos grânulos alfa de plaquetas; é transportada rapidamente para a superfície celular após a estimulação por mediadores inflamatórios como a IL-1 e o TNF- α e, logo em seguida, é reinternalizada, resultando em uma expressão passageira (EBNET & VESTWEBER, 1999). Já a E-selectina (CD62E) não é expressa constitutivamente na célula endotelial,

necessitando de síntese protéica para a sua expressão, que pode ser induzida por citocinas como a IL-1 e o TNF- α , sustentando o fenômeno de “rolling” por um período mais prolongado.

Outra importante família de moléculas de adesão é a das integrinas. São proteínas heterodiméricas, compostas por duas subunidades ou cadeias denominadas alfa (α) e beta (β), ligadas de forma não-covalente. Cada subunidade apresenta um domínio extracelular, globular e volumoso, um segmento transmembrânico e pequena projeção intracelular (HYNES, 2005). Estas glicoproteínas estão expressas na superfície de leucócitos e determinam principalmente a adesão destas células ao endotélio. Os membros da subfamília $\beta 2$ contêm quatro cadeias α diferentes, denominadas CD11a, CD11b, CD11c e CD11d, que estão acopladas a uma cadeia β comum, a CD18 (HENRICKS & NIJKAMP, 1998). O heterodímero CD11a/CD18 ou LFA-1 está expresso constitutivamente na superfície de leucócitos e interage com a ICAM-1, a ICAM-2 e a ICAM-3, moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas expressas na célula endotelial, levando à firme adesão do leucócito e favorecendo o processo de transmigração (HUBBARD & ROTHLEIN, 2000).

A superfamília das imunoglobulinas abrange um grupo de moléculas de adesão caracterizadas pela presença de duas ou mais unidades semelhantes às imunoglobulinas G (IgG), no domínio extracelular, seguido pelo domínio transmembrânico e por uma pequena sequencia citoplasmática (BEEKHUIZEN & VAN FURTH, 1993). As ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 e PECAM-1 são algumas moléculas de adesão pertencentes a esta família e medeiam, principalmente, a adesão do leucócito ao endotélio e a transmigração destas células através das células endoteliais.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivos Geral

Este projeto tem como objetivo geral avaliar o conhecimento das ações do laser de baixa intensidade sobre a reação local causada por veneno botrópico.

2.2. Objetivos específicos

Através de ensaios *in vivo*, foram avaliados os efeitos da irradiação laser de baixa intensidade (LBI) sobre os efeitos na microcirculação causada pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj), no que se refere à:

- i) Reatividade vascular
- ii) Alterações da interação leucócito-endotélio

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 288 camundongos swiss albinos machos, pesando entre 25 e 30 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiopatologia, com livre acesso a água e ração, por um período mínimo de três dias antes de serem utilizados nos experimentos. A utilização dos animais seguiu as recomendações éticas da Sociedade Internacional de Toxinologia e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). Protocolo 9251040515

3.2. Veneno

A solução de veneno sempre foi preparada no dia do experimento. Foi utilizada uma mistura liofilizada, resultante da extração de vários exemplares adultos de serpentes *Bothrops jararaca*, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As soluções de veneno foram preparadas com PBS estéril.

3.3. Planejamento experimental

Para a avaliação da interação leucócito-endotélio, foram utilizados dois protocolos diferentes quanto à aplicação do veneno. No primeiro protocolo, o VBj foi aplicado topicalmente na concentração de 1 µg/20 µL no músculo cremaster exposto e foram avaliadas as alterações nos diâmetros dos vasos, além dos parâmetros de interações leucócito-endotélio em filmagens de 1 minuto nos tempos de 10, 20 e 30 min. Em outro protocolo experimental, o veneno (1 µg/100 µL) foi injetado no subcutâneo da bolsa escrotal e o leito vascular do músculo cremaster foi preparado e avaliado 2 ou 24 horas após a injeção do veneno e o tratamento com o LBI, imediatamente após o VBj (Fig. 7)

O LBI de 685nm foi aplicado no mesmo local da aplicação do veneno em uma dosagem de 7 J, com potência de 35mv em uma área de 0,3 cm². Utilizando um total de energia de 2,1 J.

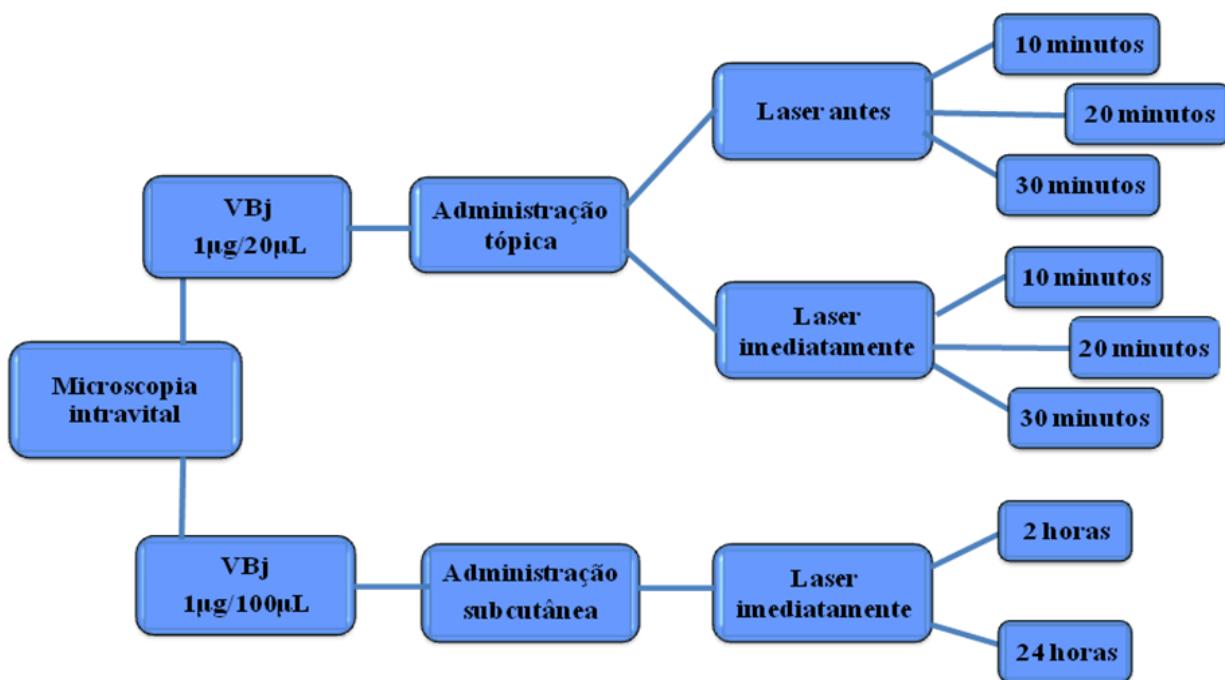


Figura 7. Diagrama do planejamento experimental

3.4. Interação Leucócito-Endotélio

Essa interação foi avaliada por ensaios de microscopia intravital. Para tanto, o músculo cremaster foi exteriorizado e montado sobre uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (BAEZ, 1973). A preparação foi analisada em um microscópio (Olympus, BX51WI) com uma objetiva 10x e acoplado a uma câmera para captação de imagens (Hamamatsu, Orca R2). As imagens foram transmitidas para um software de análise de imagens. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução PBS.

Na hora do ensaio, os camundongos foram anestesiados com uma associação de Cloridrato de Quetamina e Xilazina (8,3 mg e 3,3/100g de peso corpóreo, respectivamente) e com auxílio de uma tesoura de ponta fina foi realizada a exposição do músculo cremaster e a secção do epidídimo para o desprendimento do músculo cremaster.

Uma vênula pós-capilar foi selecionada aleatoriamente (diâmetros entre 25 e 40 μm , e comprimento de, pelo menos, 100 μm) foi observada em cada animal. Foram avaliados os leucócitos em rolamento, aderentes e emigrados. Os leucócitos em

rolamento foram contados durante um período de 1 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 μm do vaso. Os leucócitos emigrados foram avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 μm de cada lado do mesmo segmento vascular de 100 μm (Fig. 8).

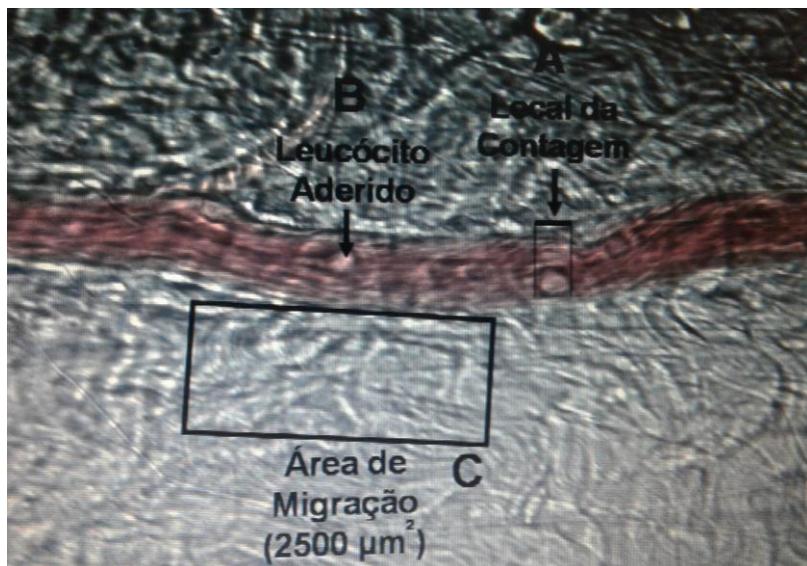


Figura 8: Vênula pós-capilar em microscopia intravital. (A) Local da contagem de rolagem dos leucócitos; (B) Leucócitos aderidos ao longo de 100 μm de comprimento da vênula; (C) Área correspondente a contagem das células que migram. Foto: Fernando Paranaiba Filgueira

3.5. Reatividade vascular

Foram medidas as vênulas pós capilares (diâmetro) antes, e após a aplicação do VBj e LBI. Elas medem entre 25 e 40 μm , e comprimento de, pelo menos, 100 μm (Fig. 9).



Figura 9. Microcirculação de vaso medindo 100 μm . Arquivo pessoal.

3.6. Irradiação com o Laser de baixa intensidade (LBI)

A aplicação da irradiação com o LBI foi realizada com a utilização do laser de baixa intensidade semicondutor modelo Theralaser (D.M.C., São Carlos, S.P. Brazil). A irradiação com o LBI foi aplicada na bolsa escrotal ou no músculo cremaster exposto, nos tempos descritos no planejamento experimental. Os parâmetros de irradiação foram os seguintes, laser vermelho: Comprimentos de onda 685 nm, Densidade de energia (DE) 7 J/cm^2 ; Potência de 35 mW; Tempo de irradiação de 60 segundos e Área Irradiada de 0,3 cm^2 .

3.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Foram considerados significantes os resultados com $p < 0,05$. O número amostral foi de 8 -10 animais/ grupo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do laser de baixa intensidade sobre o rolamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de *B. jararaca* (VBj).

Inicialmente avaliamos a aplicação de LBI topicalmente antes do veneno e verificamos o rolamento de células inflamatórias por um período de 30 min. Observou-se nos grupos controles não envenenados (PBS ou PBS + LBI), um número similar de células em rolamento. No entanto, os camundongos no qual o VBj foi aplicado topicalmente, apresentaram aumento significativo de leucócitos em rolamento em todos os tempos analisados (Fig. 10). A irradiação com o LBI causou uma diminuição significativa de leucócitos em rolamento, sendo essa diferença mais significativa no tempo de 30 min (Fig. 10 C).

Laser topicamente antes da aplicação de veneno -Rolamento

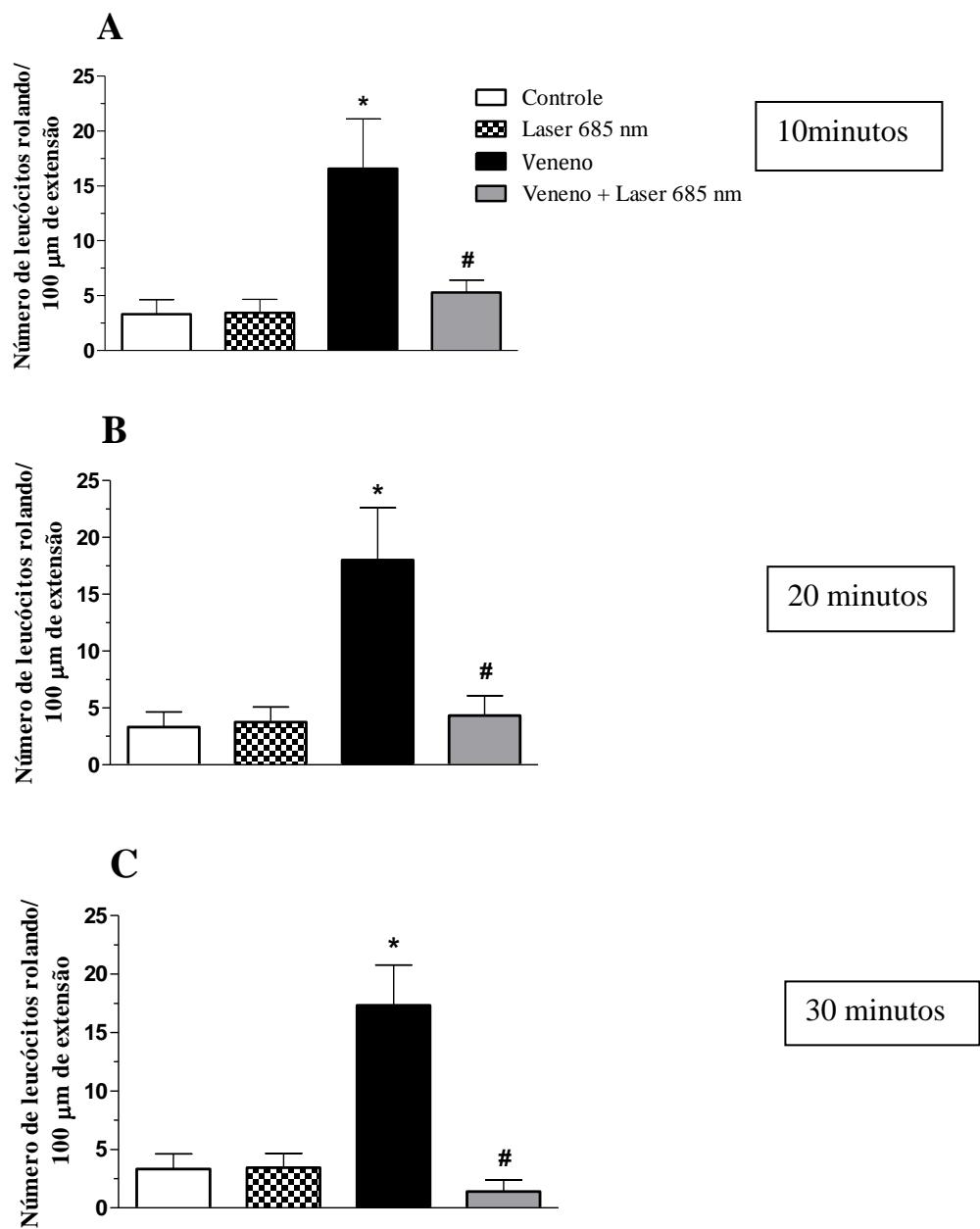


Figura 10: Células em rolamento na interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas com LBI antes da aplicação do veneno. (A) 10 min, (B) 20 min e (C) 30 min. O veneno ($1\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$) ou PBS foram aplicadas topicalmente no músculo cremaster. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente antes do veneno no mesmo local e o rolamento leucocitário foi determinado em 100 μm de extensão de vênulas pós-capilares. Resultados correspondem a média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo) * $p<0,05$ em comparação aos grupos controle, # $p<0,05$ em comparação ao grupo veneno.

4.2 Efeito do laser de baixa intensidade sobre a adesão de células inflamatórias induzidos pelo veneno de *B. jararaca* (VBj).

Ao avaliarmos o evento de adesão celular, com aplicação de LBI antes do veneno topicalmente por um período de 30 min, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos estudados até o tempo de 30 minutos (Fig. 11).

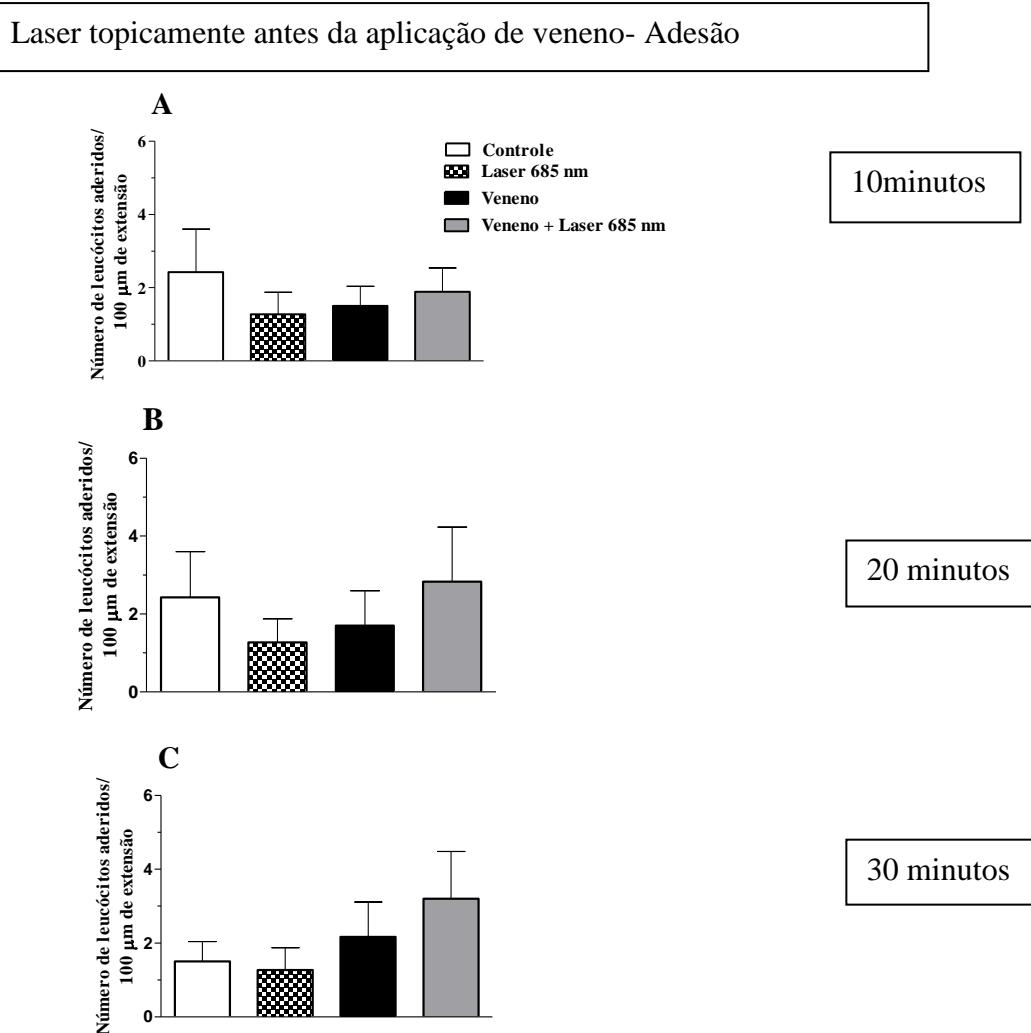


Figura 11: Células aderidas em interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas com LBI antes da aplicação do veneno. O veneno ($1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$) ou PBS foram aplicados topicalmente no músculo cremaster. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente após o veneno no mesmo local e a aderência leucocitária foi determinada em 100 μm de extensão de vênulas pós-capilares. Resultados correspondem à média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo).

4.3. Efeito do laser de baixa intensidade sobre o rolamento de células inflamatórias induzidos pelo VBj.

A seguir avaliamos a aplicação do LBI topicalmente imediatamente ao veneno e verificamos por um período de 30 min. Não houve diferença significativa em relação aos grupos controles (PBS ou PBS + LBI), quanto ao número de células em rolamento. Nos camundongos no qual o VBj foi aplicado topicalmente, apresentaram um aumento do número de leucócitos em rolamento em todos os tempos analisados (Fig. 12). A irradiação com o LBI causou uma diminuição desses leucócitos em rolamento (Fig. 12 C).

Laser aplicado topicalmente imediatamente após o de veneno- Rolamento

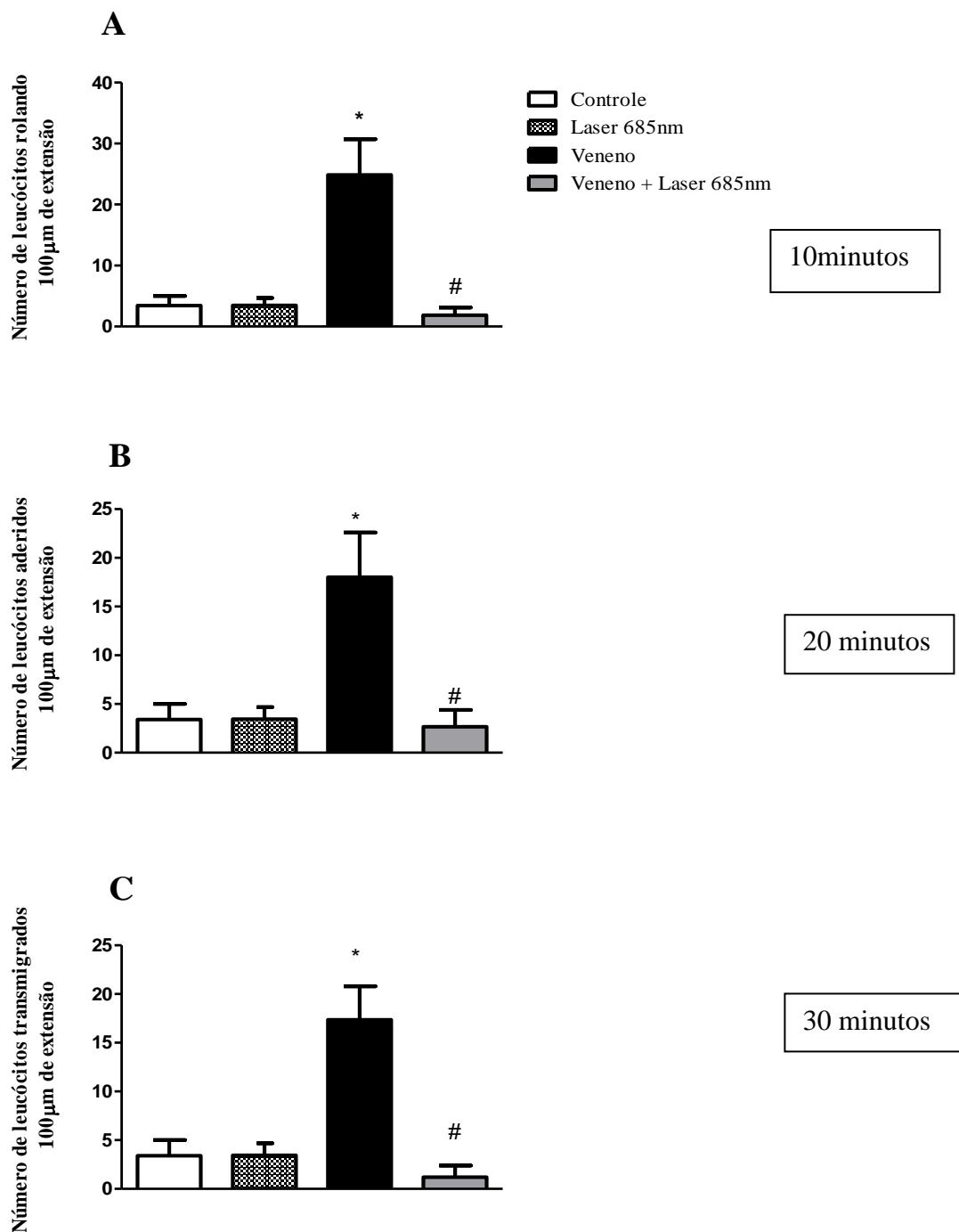


Figura 12: Células em rolamento na interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno. (A) 10 min, (B) 20 min e (C) 30 min. As amostras de veneno (1 μ g/20 μ l) ou PBS foram aplicadas topicalmente no músculo cremaster. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente ao veneno no mesmo local e o rolamento leucocitário foi determinado em 100 μ m de extensão de vênulas pós-capilares. Resultados correspondem a média e desvio padrão (n=8 animais por grupo) *p<0,05 em comparação aos grupos controle, #p<0,05 em comparação ao grupo veneno.

4.4. Efeito do laser de baixa intensidade sobre a adesão de células inflamatórias induzidos pelo VBj.

Ao avaliarmos o evento de adesão celular, com aplicação de LBI topicalmente e imediatamente ao veneno, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos estudados até o tempo de 30 minutos (Fig 13).

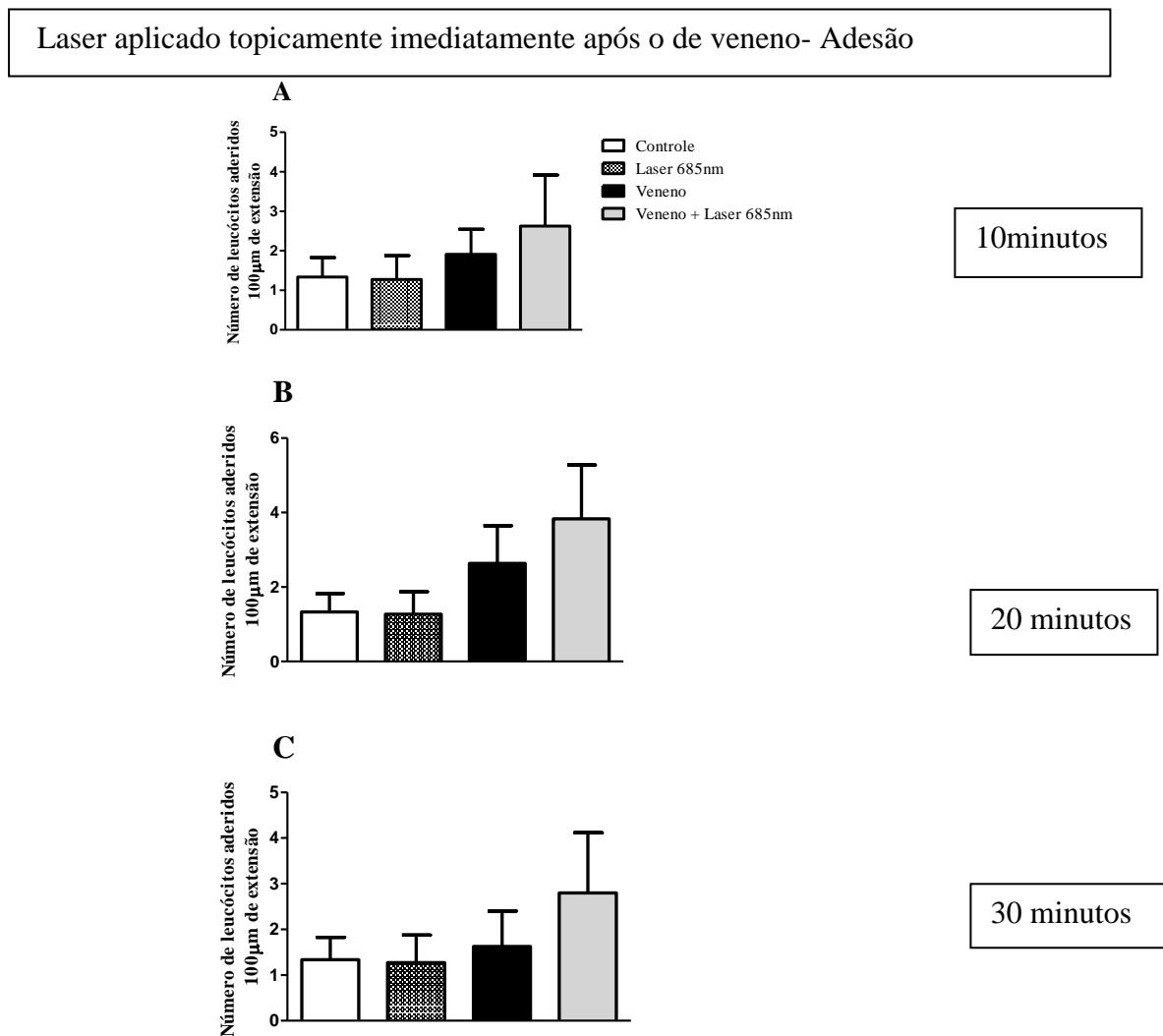


Figura 13: Células aderidas em interação leucócito-endotélio em vênulas pós capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno. O veneno ($1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$) ou PBS foram aplicados topicalmente no músculo cremaster. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente após o veneno no mesmo local do veneno e a aderência leucocitária foi determinada em $100 \mu\text{m}$ de extensão de vênulas pós-capilares. Resultados correspondem a média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo).

4.5. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de *B. jararaca* (VBj) e tratados com o laser de baixa intensidade (LBI), após 2 horas.

Para melhor copreender a capacidade do LBI em diminuir a migração de leucócitos para o foco de lesão, verificarmos o recrutamento dessas células após 2 h da aplicação do veneno e do tratamento com o LBI. O grupo injetado com VBj não teve diferença donuméro de leucócitos em rolamento quando comparado ao controle (Fig. 14A). No entanto, o tratamento como LBI foi capaz de diminuir o número de leucócitos em rolamento quando comprado ao controle e ao VBj (Fig. 14A). O grupo injetado com VBj apresentou aumento em relação ao controle quando analisamos os leucócitos aderidos (Fig. 14B) e emigrados (Fig. 14C). Assim como observado nas células em rolamento, a irradiação com o LBI causou uma diminuição dos leucócitos aderidos e transmigrados (Fig. 14).

Laser imediatamente após injeção do veneno- 2 horas

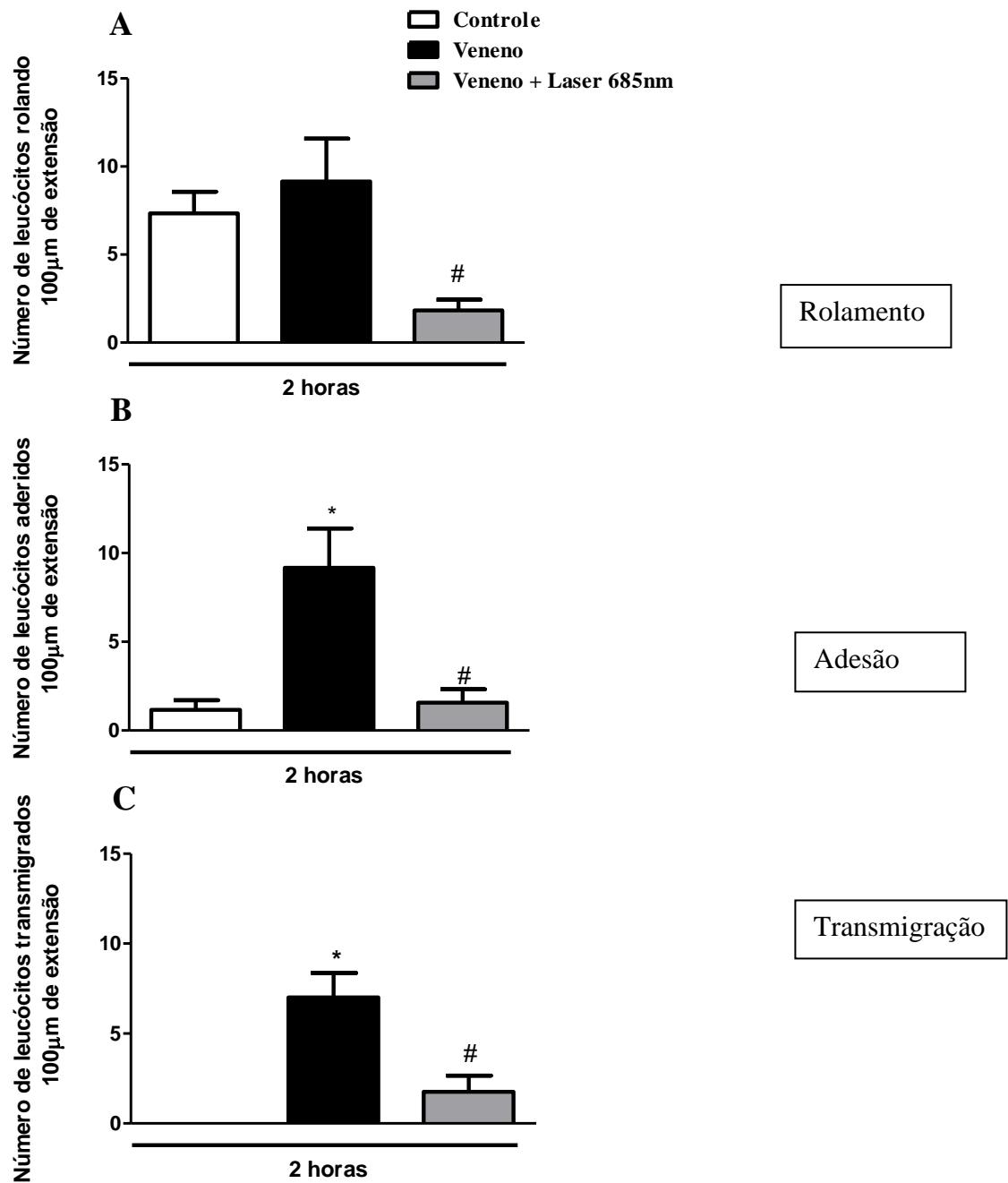


Figura 14: Células na interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno. (A) Rolamento, (B) Adesão e (C) Transmigração. O veneno ($1\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) ou PBS foram injetados no saco escrotal. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente ao veneno no mesmo local. O rolamento e adesão foram determinados em 100 µm de extensão de vênulas pós-capilares. A transmigração 50 µm de cada lado do mesmo segmento vascular de 100 µm e foram avaliados 2 h após a aplicação do veneno e LBI. Resultados correspondem a média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo) * $p<0,05$ em comparação aos grupos controle, # $p<0,05$ em comparação ao grupo veneno.

4.6. Recrutamento de células inflamatórias induzidos pelo veneno de *B. jararaca* (VBj) e tratados com o laser de baixa intensidade (LBI), após 24 horas.

Para verificar a capacidade do LBI em diminuir a migração de leucócitos para o foco de lesão, analisamos o recrutamento dessas células após 24 h da aplicação do veneno e do tratamento com o LBI. Na avaliação do rolamento da células obtivemos um número aproximado de células, não havendo diferença significativa (Fig. 15A). Quando avaliamos a adesão e transmigração celular após a injeção do veneno, observamos que houve um aumento do número de leucócitos comparado com o grupo controle e o tratamento com o LBI causou uma diminuição significativa, tanto na adesão quanto na transmigração celular, quando comparado ao grupo laser (15 B e C).

Laser imediatamente após injeção do de veneno- 24 horas

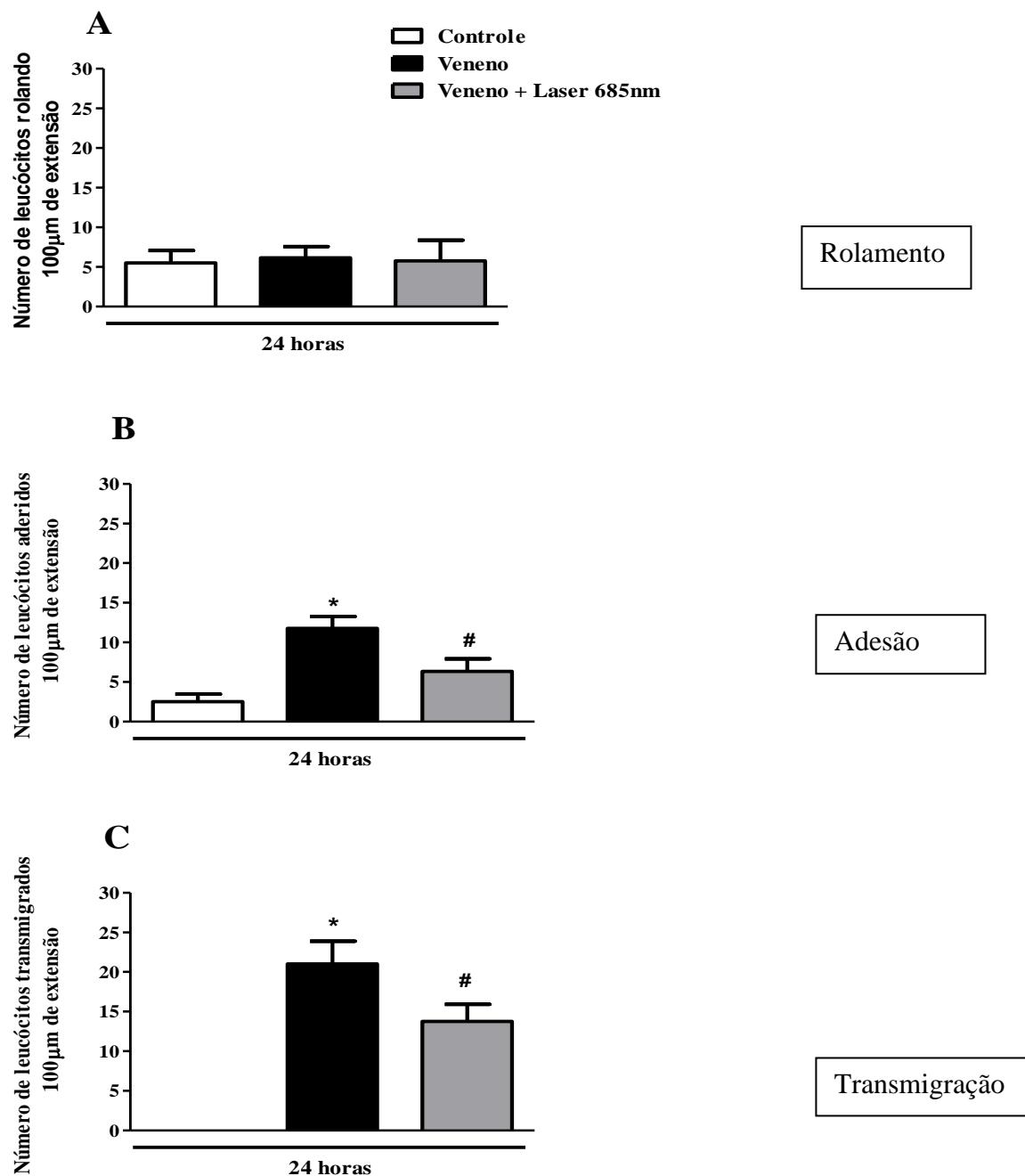


Figura 15: Células na interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e e irradiadas com LBI imediatamente a aplicação do veneno. (A) Rolamento, (B) Adesão e (C) Transmigração. O veneno (1 μ g/100 μ l) ou PBS foram injetados no saco escrotal. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente ao veneno no mesmo local. O rolamento e adesão foram determinados em 100 μ m de extensão de vênulas pós-capilares. A transmigração 50 μ m de cada lado do mesmo segmento vascular de 100 μ m e foram avaliados 24 h após a aplicação do veneno e LBI. Resultados correspondem a média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo. * $p<0,05$ em comparação aos grupos controle, # $p<0,05$ em comparação ao grupo veneno.

4.7. Efeito do LBI sobre a reatividade vascular após a aplicação tópica do veneno de *B. jararaca* (VBj).

A reatividade vascular foi avaliada através da medida do diâmetro das vênulas pós-capilares no período de 30 min da aplicação do VBj e irradiação do LBI. Nossos resultados demonstraram que no tempo de 10 min não houve diferença entre os grupos (Fig. 16A). Nos tempos de 20 min, o veneno causou vasodilatação, que não foi diferente do controle, entretanto, o LBI causou vasoconstrição que foi estatisticamente diferente do grupo veneno. No tempo de 30 min, o VBj causou vasodilatação estatisticamente diferente dos controles e, novamente, o LBI causou vasoconstrição estatisticamente diferente do VBj (Fig. 16 B e C).

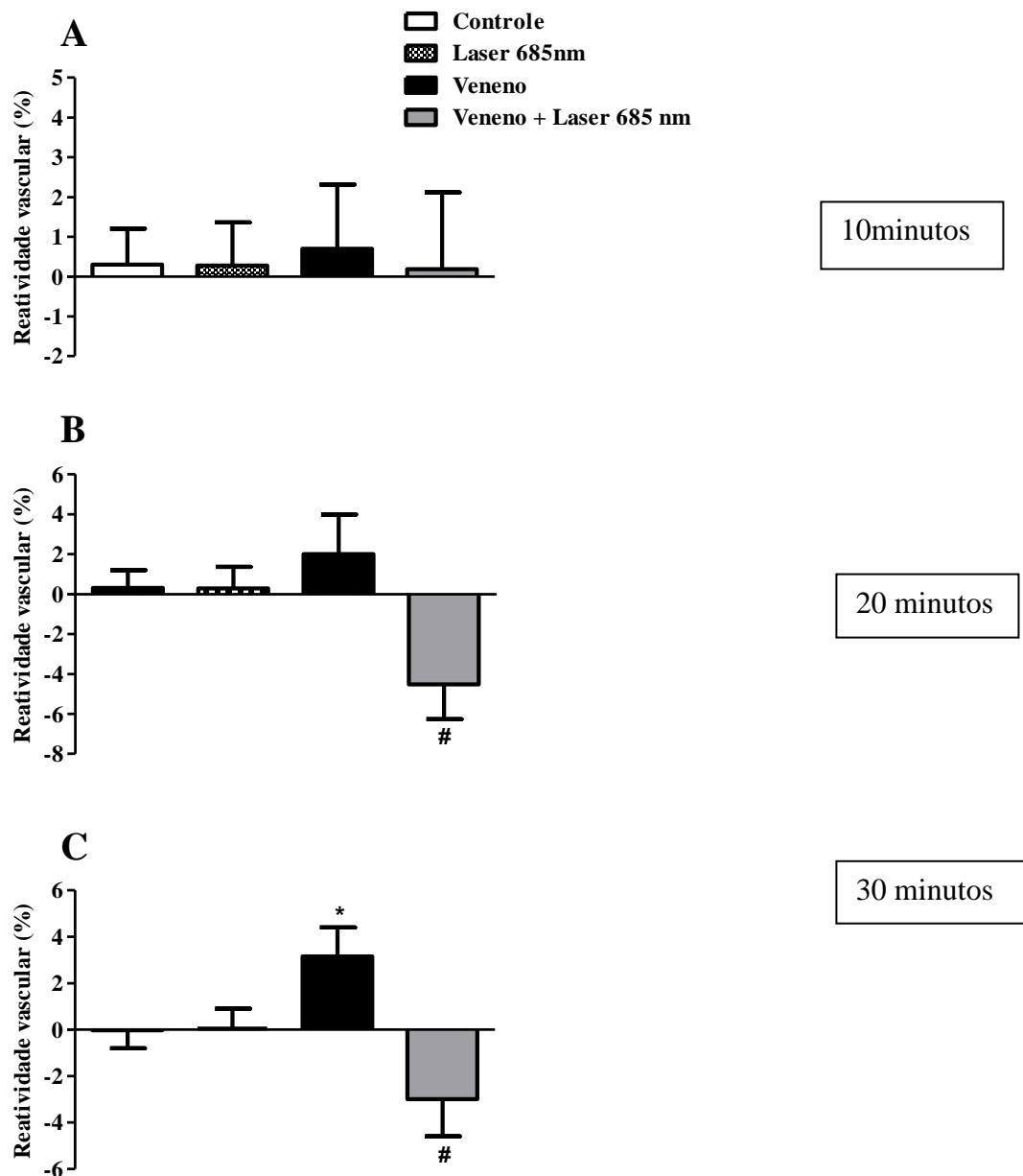


Figura 16: Diâmetro das vênulas pós-capilares do músculo cremaster de camundongos induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) e imediatamente irradiadas com o LBI.
(A) 10minutos **(B)** 20 minutos **(C)** 30 minutos. As amostras de veneno ($1\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$) ou PBS foram aplicadas topicalmente no músculo cremaster. O LBI (685 nm) foi aplicado imediatamente após o veneno no mesmo local e o diâmetro das vênulas foi medido 10, 20 e 30 min da aplicação do VBj. Resultados correspondem à média e desvio padrão ($n=8$ animais por grupo). * $p<0,05$ em comparação aos grupos controle, # $p<0,05$ em comparação ao grupo veneno.

5. DISCUSSÃO

A busca por alternativas complementares à soroterapia é decorrente da falta de eficiência terapêutica relacionada à neutralização dos efeitos locais causados por venenos botrópicos (ROSENFELD, 1971). A literatura tem sugerido a terapia com LBI como uma alternativa eficaz para o tratamento de acidentes causados por serpentes botrópicas devido sua capacidade de diminuir vários efeitos locais, particularmente a inflamação, após envenenamento botrópico experimental (DOURADO *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2009; NADUR-ANDRADE *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos do LBI não são conhecidos.

A inflamação é um processo que envolve múltiplos fatores que agem em uma complexa rede enzimática sendo que o ingresso de leucócitos no local da inflamação é o evento crucial na patogênese da inflamação (KASAMA *et al.*, 1995). No presente estudo, a microscopia intravital, que permite a visualização da microcirculação sanguínea e a interação leucócito-endotélio, além de importantes eventos e alterações que possam ocorrer nesse sistema (GAVINS e CHARTTEJEE, 2004), foi empregada para a observação “*in vivo*” da interação leucócito-endotélio, com o intuito de verificar a ação do LBI sobre a migração leucocitária causada pelo veneno de *B. jararaca*. A compreensão da ação da fotobiomodulação em termos de diminuição da migração leucocitária pode fornecer uma estratégia terapêutica importante sobre a capacidade dessa terapia em promover uma melhora da lesão local causado por venenos botrópicos (BARBOSA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

Os parâmetros do laser usado neste estudo não demonstraram efeitos sobre a microcirculação dos animais controles (aplicação tópica de PBS), esse resultado esta de acordo com a literatura que mostra que a FBM age principalmente em células com funções comprometidas ou em desequilíbrio homeostático (MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011).

A aplicação tópica do VBj no músculo cremaster causou aumento do número de células em rolamento. No entanto, não observamos células aderidas até o período de 30 min. Em contraste ao nosso resultado, Farsky *et al.* (1999) demonstraram uma diminuição do rolamento e aumento de células aderidas, utilizando o mesmo protocolo experimental também com o veneno do *B. jararaca*, no entanto o modelo animal utilizado foi o rato. Essa discrepância indica que diferentes espécies animais possam

induzir diferentes respostas na microcirculação. A irradiação com o LBI aplicado antes ou imediatamente, no mesmo local à aplicação do veneno, causou uma redução significante da etapa de rolamento.

Para melhor verificar a ação do LBI sobre a migração leucocitária causada pelo VBj, avaliamos esse efeito no tempo de 2 e 24 horas da injeção subcutânea do veneno no saco escrotal dos camundongos, esses tempos foram escolhidos com base na literatura que demonstra serem tempos representativos de predomínio de adesão (2 h) e transmigração (24 h) isoladamente, após a injeção de VBj (ZYCHAR et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que o VBj causou aumento de células aderidas e transmigradas nos tempos de 2 e 24 horas da injeção do veneno, esses resultados estão de acordo com dados anteriores da literatura (ZYCHAR et al., 2010; FARSKY et al., 1999). A aplicação do LBI causou redução tanto das células aderidas quanto das células transmigradas, nos dois tempos avaliados. Vários estudos demonstram a eficácia da FBM em reduzir a migração leucocitária em diversos processos inflamatórios. Neste sentido a literatura mostra redução de leucócitos em artrite experimental (CARLOS et al., 2014; PALOTTA et al., 2012), tendinite (XAVIER et al., 2010); inflamação pulmonar (MIRANDA DA SILVA et al., 2015); mastite (WANG et al., 2014), entre outros.

O extravasamento de leucócitos requer o rolamento dessas células no endotélio mediado pela molécula de adesão LECAM-1, a firme adesão que é dependente de CD11b e ICAM-1 e a transmigração que é mediada por PECAM-1 (LIU et al., 2012). A LECAM-1 é expressa constitutivamente em neutrófilos e, após ativação, permite o rolamento desses leucócitos na superfície das células endoteliais, durante a fase inicial da cascata de migração (KISHIMOTO et al., 1989). As moléculas de adesão LECAM-1 são rapidamente externalizadas na membrana celular, enquanto a expressão de CD11b requer ativação na membrana de leucócitos, facilitando o contato firme ao endotélio vascular seguido pelo extravasamento (CARLOS et al., 1994). Neste sentido, já foi demonstrado que a migração de leucócitos induzida pelo VBj é dependente das moléculas de adesão LECAM-1, ICAM-1, LFA-1 e PECAM-1 (ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002), assim é possível inferir que o LBI reduza a interação de leucócitos com células endoteliais, possivelmente interferindo na ativação de moléculas de adesão responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias.

Sabe-se que citocinas como o TNF- α e IL-6 são liberados no envenenamento por *B. jararaca* e participam do fenômeno de migração leucocitária (PETRICEVICH et al., 2000; ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002). Estas citocinas são consideradas como mediadores chave na resposta inflamatória por participar da indução de vários componentes importantes neste processo, como a indução de moléculas de adesão, principalmente de VCAM-1 e ICAM-1, e assim, aumentando a interação leucócito-endotélio e a permeabilidade vascular (KUMAR et al., 2005; ANJOS-VALOTTA et al., 2006, ZAMUNER e TEIXEIRA 2002). Neste sentido, já foi demonstrado que o LBI diminui a liberação, tanto de TNF- α quanto de IL-6 em diferentes modelos de inflamação (MACEDO et al., 2015). Além disso, já foi constatado, através da mesma técnica de microscopia intravital, que a falta de efetividade do antiveneno é prejudicada devido à demora na interação do veneno e antiveneno no local da lesão (BATTELINO et al, 2003). Assim, é possível que a diminuição dos leucócitos migrados em nosso modelo experimental, tenha ocorrido indiretamente, devido à diminuição causada pelo LBI dos mediadores inflamatórios liberados no local, como histaminas, leucotrienos, enzimas e algumas citocinas (incluindo TNF, IL-1, IL-6 e quimiocinas) que contribuem para a migração leucocitária. Neste sentido, estudos do nosso grupo utilizando o LBI no comprimento de onda de 685 nm vermelho com densidade de energia de 2,2 J/cm² aos 30 min e 3 h após a inoculação do veneno, foi verificado que o LBI diminui os níveis de expressão de RNAm das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , assim como os receptores de cinina B1 e B2 após a injeção do veneno de *B. moojeni*, no tecido plantar de camundongos (NADUR-ANDRADE, 2016). Ainda, em modelo experimental de artrite, utilizando o laser no comprimento de onda de 660 nm, no tempo de 10 segundos, potência de 10 mW, energia total de 2,5 J/cm², o laser inibiu significativamente o influxo de leucócitos, a liberação de IL-1 e IL-6 e também a atividade das metaloproteinase-2 e 9, na cavidade articular (CARLOS et al 2014).

O aumento de permeabilidade vascular é a primeira alteração que ocorre na microvasculatura durante a inflamação (VANE, 1993). A vasodilatação é induzida pela ação de mediadores como a histamina e o óxido nítrico, além disso, causa o extravasamento de fluido rico em proteínas para o interstício, seguido de migração e acúmulo de leucócitos no local da lesão. A formação de fendas no endotélio venular, é geralmente reversível e curta, de 15 a 30 minutos (LENTSCH e WARD, 2000). Para verificar se o LBI teria algum efeito na fase inicial do processo inflamatório, avaliamos

a reatividade vascular após a aplicação tópica do VBj e o tratamento com o LBI, no período de 30 min. Nossos resultados demonstraram que o VBj causou vasodilatação em vênulas pós-capilares, após 30 min da aplicação do veneno, que é uma das primeiras manifestações da inflamação aguda ocasionando a aumento do fluxo sanguíneo. O tratamento tópico com o LBI causou uma vasoconstrição já aos 20 min após a aplicação do VBj e seu tratamento. É possível que, em nosso modelo experimental, essa vasoconstrição causada pelo LBI tenha colaborado para a diminuição do fluxo sanguíneo reduzindo a quantidade de leucócitos que chegaram ao local de lesão, consequentemente reduzindo a migração.

Em resumo, os resultados apresentados em nosso estudo fornecem contribuição importante para o entendimento do efeito anti-inflamatório do LBI na resposta inflamatória causada por venenos botrópicos, particularmente nas etapas envolvidas no recrutamento leucocitário.

6. CONCLUSÃO

Considerando as análises de microscopia intravital realizadas em músculo cremaster de camundongos após a injeção do veneno de *B. jararaca*, bem como os parâmetros utilizados, podemos concluir que o laser de baixa intensidade causa diminuição de leucócitos no local de lesão por reduzir as etapas de rolamento, firme adesão e transmigração responsáveis pelo processo de migração leucocitária. Além disso, o LBI causa vasoconstrição contribuindo para a diminuição da migração leucocitária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anjos-Valotta EA, Martins JO, Oliveira MA, Casolari DA, Britto LR, Tostes RC, Fortes ZB, Sannomiya P. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in diabetic rats: role of insulin. *Inflamm Res.* 2006 Jan;55(1):16-22.

Albertini R., Villaverde AB, Ambire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA, Costa M. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy (LLLT). *Photomedicine Laser Surgery*, 2008; v.26, p.19-23.

Barraviera B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. JBM, São Paulo, 1993; 65(4): 209-250.

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.

Barbosa AM, Villaverde AB, Souza LG, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 2008; 1;51(7):1236-44.

Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Soares AM, Zamuner SF, Cogo JC, Zamuner SR. 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.

Battelino C, Piazza R, Silva AMG, Cury Y, Farsky HP. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* 2003; 41, 5:583-593.

Beekhuizen H, Van Furth R. Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J. Leukoc. Biol.* 1993; 54: 363-78.

Bieber CP, Jamieson S, Raney A, Burton N, Bogarty S, Hoppe R, Kaplan HS, Strober S, Stinson EB. Cardiac allograft survival in rhesus primates treated with combined total lymphoid irradiation and rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation.* 1979; 28(4):347-350.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther.* 1994;62(3):325-72. Review.

Bolaños R, Rojas O, Ulloa Flores CE. [Biomedical aspects of 4 cases of snake bites by Lachesis muta (Ophidia: Viperidae) in Costa Rica]. *Rev Biol Trop.* 1982 Jul;30(1):53-8. Spanish.

Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DA, Oliveira JR. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(7):500-8.

Búrigo AC, Calixto JB, Medeiros YS. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. *J Pharm Pharmacol.* 1996; 48(1):106-11.

Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite R. P , Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, Chudzinski AM, Castro SCB , Kamiguti AS, Kelen EMA , Hirata MH, Mirandola RMS, Theakston RDG, Warrell DA. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q J Med.* 1993;86(5):315-25.

Carlos FP, de Paula Alves da Silva M, de Lemos Vasconcelos Silva Melo E, Costa MS, Zamuner SR. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(2):757-63

Carlos TM, Harlan J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules, 1994 Blood 84: 2068–2101.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. IEEE J Sel Top Quantum Electron. 2016;22(3).

Doin-Silva R., Baranauskas V, Rodrigues-Simioni L, da Cruz-Höfling MA. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. Photochem Photobiol. 2009; 85(1):63-9.

Dourado DM, Baranauskas V, Cruz-Hofling MA. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. Lasers surg. med., 2003; 33: 352-357.

Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. Histochem. Cell Biol., 1999; 112: 1-23.

Farsky SH, Gonçalves LRC, Cury Y. Characterization of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: na intravital microscopic study.;Toxicon 1999;37, 1079-1083.

Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies 1997, Toxicon;35(2):185-93.

Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior EC, de Carvalho P de T. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. Lasers Med Sci. 2014;29(1):313-9.

Flores CA, Zappellini A, Prado-Franceschi J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. Toxicon. 1993;31(12):1551-9.

Florey HW. Inflammation. General Pathology, 4 ed. Ed., Philadelphia, Saunders, 1970. P.1-174.

Gavins FN, Chatterjee BE. Intravital microscopy for the study of mouse microcirculation in anti-inflammatory drug research: focus on the mesentery and cremaster preparations. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004; 49(1):1-14.

Gonçalves LRC, Mariano M., 2000. Local hemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm* 9, 101-107.

Gupta A, Avci P, Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(8):422-437. Review.

Gutiérrez JM, Cerdas L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. *Rev Biol Trop.* 1984;32(2):213-22. Review. Spanish.

Gutiérrez JM, Leon G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A , Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 1998, 36: 1529–1538.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon*. 1995; 33(11):1405-24. Review.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 2000;82(9-10):841-50. Review.

Hati R, Mitra P, Sarker S, Bhattacharyya KK. Snake venom hemorrhagins. *Crit Rev Toxicol.* 1999;29(1):1-19. Review.

Hubbard A, Rothlein, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 13791386.

Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. *J Investig Med.* 1995;43(1):58-67.

Khadra, M; Kasem, N; Haanaes, H.R; Ellingsen, J.E; Lyngstadaas, S.P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(6):693-700.

Kishimoto TK, Julita MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil MAC-1 and mel-14 adhesion protein inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245:1238-1241, 1989.

Kumar A, Kingdon E, Norman J. The isoprostane 8-iso-PGF₂alpha suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms. *FASEB J.* 2005 Mar; 19(3):443-5.

Lentsch AB, Ward PA: Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* , 2000; 190:343

Liu G, Place AT, Chen Z., Brovkovich VM, Vogel SM, Muller WA, Skidgel RA, Malik AB and Minshall RD. ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood* 2012, 120: 1942–1952.

Lomonte C, Petronelli S, Antonelli M, Prudenzano R, Giammaria B, Marchio G, Losurdo N, Basile C. Embolization of haemodialysis arteriovenous fistulas complicated by venous hypertension: a feasibility study. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(1):199-202.

Macedo AG, Krug AL, Souza LM, Martuscelli AM, Constantino PB, Zago AS, Rush JW, Santos CF, Amaral SL. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. *Steroids.* 2016;107:30-6.

Mafra de Lima F, Villaverde AB, Salgado MA, Castro-Faria-Neto HC, Munin E, Albertini R, Aimbre F. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat. J Photochem Photobiol B. 2010;101(3):271-8

Manual de Diagnóstico e Tratamentos de Acidentes Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. Indian J Exp Biol. 2011;49(6):423-8.

Miranda da Silva C, Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitoretti LB¹ Saraiva Câmara NO, 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

Moura-da-Silva AM, Baldo C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. Toxicon. 2012;60(3):280-9.

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.

Nadur-Andrade N, Dale CS, Oliveira VR, Toniolo EF, Feliciano RD, da Silva JA Jr, Zamuner SR. Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 17;10(10)

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;1;4(3).

Nishijima CM, Rodrigues CM, Silva MA, Lopes-Ferreira M, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Anti-hemorrhagic activity of four Brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom Molecules. 2009;9;14(3):1072-80

Ohsaka, A. Suzuki, K.; Ohashi, M. The sputing of erythrocytes through junctions of the vascular endothelium treated with snake venom. 1973, Microvas. Res., 10: 208.

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;27(1):71-78.

Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon. 2000;38(9):1253-66.

Queiroz LS, Petta CA. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1984;26(5):247-53.

Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. Braz J Med Biol Res. 1985;18(3):337-40.

Rosenfeld G, Kalen EM. [Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application]. Rev Paul Med. 1971;77(4):149-50.

Silveira KS, Boechem NT, do Nascimento SM, Murakami YL, Barboza AP, Melo PA, Castro P, de Moraes VL, Rocco PR, Zin WA. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. Respir Physiol Neurobiol. 2004, 15;139(2):167-77.

Souza LG, 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.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 2005; 23: 161–166.

Takeya H, Oda K, Onikura A, Miyata T, Iwanaga S, Nikai T, Sugihara H, Omori-Satoh T. The structure and function relationships of hemorrhagic factors isolated from the venoms of *Trimeresurus flavoviridis* and *Crotalus ruber ruber*. *Jpn J Med Sci Biol.* 1990;43(6):252-3.

Teixeira CFP, Zamuner SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Gutierrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2005; v. 86, p. 107-115.

Uchoa, LRDA, Dantas ME, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho NLG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An. Bras. Dermatol.* 2010; 85(6): 849-855.

Vane J. Control of the circulation by endothelial mediators. Inaugural G.B. West Memorial Lecture. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993; v. 101, p. 333-345.

Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev.* 2007;218:178-96.

Wang Y, He X, Hao D, Yu D, Liang J, Qu Y, Sun D, Yang B, Yang K, Wu R, Wang J. Low-level laser therapy attenuates LPS-induced rats mastitis by inhibiting polymorphonuclear neutrophil adhesion. *J Vet Med Sci.* 2014;76(11):1443-50.

Xavier M, David DR, Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, Silva Jr. JA, Salgado MACS, Aimbire F, Albertini R. Anti-Inflammatory Effects of Low-Level Light Emitting Diode Therapy on Achilles Tendinitis in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, 42:553–558.

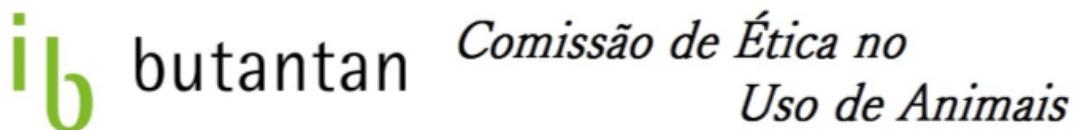
Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CF. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions peritoneal leucocytes in vivo. *Toxicon*, 2001; v. 39, n. 10, p. 1505-1513.

Zamuner SR, Teixeira CFP. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm*, 2002; v.11, n.6, p. 351-357.

Zamuner SR., Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, de Fátima Pereira Teixeira C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids and role of adhesion molecules in leucocyte infiltration. *Toxicon*, 2005, v. 46, n. 7, p. 806-813.

Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LRC. Contribution of metalloproteases, serine proteases, and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*. 2010;55(2-3): 227-34.

8. ANEXO



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da eficácia do laser de baixa intensidade sobre alterações induzidas pelo veneno da serpente Bothrops jararaca na microcirculação do músculo cremaster de camundongos", protocolado sob o CEUA nº 9251040515, sob a responsabilidade de Luis Roberto De Camargo Gonçalves e equipe; Ingrid Sestrem Linhares; 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) - encontra-se 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, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan do Instituto Butantan (CEUAIB) em reunião de 22/07/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of the effectiveness of low-intensity Laser on the amendments induced by Bothrops jararaca snake venom in the cremaster microcirculation of mice.", utilizing 256 Heterogenics mice (256 males), protocol number CEUA 9251040515, under the responsibility of Luis Roberto De Camargo Gonçalves and team; Ingrid Sestrem Linhares; 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) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, 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 Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 07/22/2015.

Vigência da Proposta: de 08/2015 a 12/2016

Laboratório: Laboratório De Fisiopatologia

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Camundongos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 60 a 70 dias N: 256

Linhagem: Swiss

Peso: 25 a 30 g

Resumo: As serpentes do gênero Bothrops são as responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos no Brasil, apresentando efeitos sistêmicos graves, além de induzirem um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais como edema, mionecrose, dor, hemorragia e uma intensa reação inflamatória. A utilização do soro antibiótico desempenha a função de neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, minimizando assim seus efeitos sistêmicos, porém sua eficiência não se estende às manifestações locais, sendo assim necessário o uso de outro recurso terapêutico para o controle dessa manifestação. A laserterapia de baixa intensidade é uma alternativa de tratamento em situações de injuria, devido a seus efeitos biológicos, tais como analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes, sendo considerado um recurso bioestimulante em tecidos.

São Paulo, 23 de julho de 2015

A assinatura é feita em cursive, em preto, sobre um fundo branco.

Prof. Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan