

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**NIKELE NADUR ANDRADE**

**EFEITO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO NO EDEMA E HIPERALGESIA  
INDUZIDO PELO VENENO *BOTHROPS MOOJENI* E POR DUAS  
MITOXINAS ISOLADAS DESTE VENENO**

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> STELLA REGINA ZAMUNER**

**São Paulo, SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**NIKELE NADUR ANDRADE**

**EFEITO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO NO EDEMA E HIPERALGESIA  
INDUZIDO PELO VENENO *BOTHROPS MOOJENI* E POR DUAS  
MITOXINAS ISOLADAS DESTE VENENO**

Tese apresentada à Universidade  
Nove de Julho para a obtenção do  
título de Doutor em Ciências da  
Reabilitação

**ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> STELLA REGINA ZAMUNER**

**São Paulo, SP**

**2014**

Andrade, Nikele Nadur.

Efeito da Fotobioestimulação no edema e hiperalgesia induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni* e por duas miotoxinas isoladas deste veneno.  
/Nikele Nadur Andrade. 2014.

118 f..

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2014.

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

1. *Bothrops moojeni*. 2. Miotoxina. 3. Dor inflamatória. 4. Edema.  
I. Zamuner, Stella Regina. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

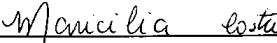
Aluno(a): NIKELE NADUR ANDRADE

Título da Dissertação: "EFEITO DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO NO EFEITO LOCAL INDUZIDA PELO VENENO DE BOTHROPS MOOJENI E MIOTOXINAS ISOLADAS".

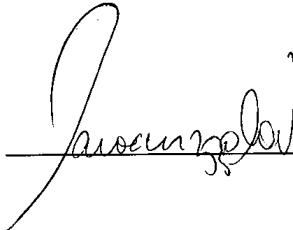
Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA



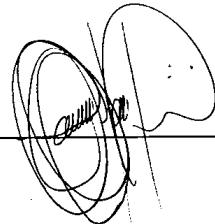
Membro: PROFA. DRA. SANDRA COCCUZZO SAMPAIO VESSONI



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre apoiaram as minhas decisões, incentivaram-me nos momentos difíceis e vibraram nas minhas vitórias. Obrigado por todo o amor.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, agradeço pelos dons da Ciência, coragem, paciência, entendimento que se fizeram necessários durante toda essa minha jornada acadêmica.

Aos meus amados pais Luiz e Rogéria que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

À minha querida orientadora, prof<sup>a</sup> Stella Regina Zamuner pela grandiosa ajuda no desenvolvimento desse estudo, por toda paciência, carinho e apoio. Por ser mais que brilhante professora, mas um ser humano maravilhoso do qual admiro e tenho como modelo.

À Prof<sup>a</sup> Camila Squarzoni Dale pela presteza e por todo envolvimento com o trabalho. Sua valiosa ajuda foi de fundamental importância.

Aos alunos de doutorado da USP Elaine Flamia Tomiolo e Adriano Franciosi que gentilmente sempre foram muito solícitos em me ajudar.

À aluna de iniciação científica Victória R. da Silva Oliveira que se tornou minha amiga, agradeço pela amizade, carinho e disponibilidade em ajudar para concretização deste trabalho.

Ao Profº José Antônio pelas contribuições inerentes ao PCR e ao Profº José Carlos Cogo pela doação do veneno e Profº Andreimar M. Soares da Universidade Federal de Rondônia pela doação das miotoxinas.

As minhas amigas, companheiras de “lutas”, de tristezas e de alegrias Paula Costa, Camila Godoy e Nadhia Helena Costa, juntas aprendemos e amadurecemos demais nessa etapa da vida. Obrigada por me ajudarem, pelos sorrisos, pelos abraços, pelo companheirismo, por tudo. Sem vocês tudo seria bem mais difícil.

Aos professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho.

Ao laboratório de Ensino e Pesquisa (IEP) do Hospital Sírio Libanês e ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela colaboração com o trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro. Processo: 2012/09710-8.

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) pela grande oportunidade e pela bolsa no Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação.

Enfim a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

O envenenamento induzido por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizada por danos no tecido local envolvendo hemorragia, mionecrose e uma resposta inflamatória e hiperalgésica de instalação rápida e intensa. O tratamento mais eficaz é a terapia de antiveneno, capaz de reverter os sintomas sistêmicos, porém é ineficaz em neutralizar a resposta local.

Neste estudo foi avaliado o efeito da fotobioestimulação com o laser de baixa potência (LBP) e o light emitting diode (LED) no edema e hiperalgesia induzido pelo veneno de *B. moojeni* e duas mitoxinas isoladas deste veneno a MjTX-I e -II. Foi utilizado o LBP no comprimento de onda de 685 nm e densidade de energia de 2,2 J/cm<sup>2</sup>, do LEDs vermelho com comprimento de onda de 635 nm, e densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> e LED infravermelho no comprimento de onda 945 nm e densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>. O efeito do LBP e LED foram avaliados quando aplicados sozinho ou conjuntamente com o antiveneno. Nossos resultados demonstraram que tanto o LBP quanto o LED reduziram o efeito hiperalgésico induzido pelo veneno de *B. moojeni* sozinho ou em combinação com o tratamento do antiveneno. Verificamos que o LBP foi eficaz em reduzir níveis de transcrição de RNAm que traduz as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ , assim como os receptores de bradicinina B1 e B2. Ainda, o LBP foi capaz de aumentar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, no músculo plantar de camundongos.

O tratamento com o LBP e LED reduziu o edema podal induzidos pela MjTX-I e MjTX-II de maneira semelhante. A combinação do soro antibotrópico com o LED não melhorou o efeito da terapia de baixa potência sozinha, na redução da formação de edema podal induzido pela MjTX-I ou II.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o LBP e o LED nos parâmetros utilizados possam ser uma alternativa para o tratamento dos efeitos locais dos acidentes causados por serpentes botrópicas assim como uma importante ferramenta para se estudar os mecanismos envolvidos no processo inflamatório induzido por venenos ou toxinas.

**Palavras chaves:** *Bothrops moojeni*, miotoxina, dor inflamatória, edema, laser de baixa potência, LED.

## ABSTRACT

Envenoming induced by *Bothrops* snakes is characterized by drastic local tissue damage involving hemorrhage, myonecrosis and proeminent inflammatory and hyperalgesic response. The most effective treatment is antivenom therapy, which is ineffective in neutralizing the local response. Herein, it was evaluated the effectiveness of light-emitting diode (LED) at wavelengths of 635 and 945 nm in reducing inflammatory hyperalgesia induced by *Bothrops moojeni* venom (BmV) or myotoxins (MjTX-I and -II) isolated from this venom. LBP was irradiated at a wavelength of 685 nm and 2.2 J/cm<sup>2</sup> energy density, red LED in wavelength of 635 nm and 4 J/cm<sup>2</sup> energy density and infrared LED in 945 nm wavelength and energy 4 J/cm<sup>2</sup> density. The effect of LBP and LED were evaluated when applied alone or in combination with the antivenom. Our results demonstrated that both LBP as well as LED reduced the hiperalgesic effect induced by the *B. moojeni* venom alone or in combination with the antivenon treatment. We note that the LBP was effective in reducing levels of mRNA transcript that translates the pro-inflammatory cytokines IL-1  $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , as well as receptors for bradykinin B1 and B2. Still, the LBP was able to increase the expression of anti-inflammatory cytokine IL-10, on muscle plant of mice.

Treatment with LBP and LED reduced edema formation induced by MjTX MjTX-I and-II in a similar manner. The combination of antivenom with the LED did not improve the effect of low-level therapy alone, in reducing the edema formation induced by MjTX-I or II.

The results obtained in this study have shown that LBP and LED in the parameters used can be an alternative for the treatment of the local effects caused by bothropic venom accidents as well as an important tool for studying the mechanisms involved in the inflammatory process induced by poisons or toxins.

**Key words:** *Bothrops moojeni*, myotoxin, inflammatory pain, edema, low level laser, LED.

# ÍNDICE

<b>1.CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 Acidente Botrópico e sinais clínicos	18
1.2 <i>Bothrops moojeni</i>	19
1.3 Resposta Inflamatória aguda no envenenamento	21
1.4 Dor Inflamatória	22
1.4.1 Marcação neural e nocicepção	25
1.5 Soroterapia	26
1.6 Terapia com Laser de Baixa Potência	27
1.7 Terapia com LED	29
1.8 Fotobioestimulação e acidente ofídico	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
3.1 Artigo publicado na revista Photochemistry and Photobiology	32
3.2 Artigo submetido à revista Photochemical & Photobiological Sciences	52
3.3 Dados ainda não publicados	72
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>72</b>
Animais	72
Veneno	72
Laser	72
Hiperalgesia mecânica e alodínia táctil	73
Hiperalgesia Térmica	73
Avaliação da neutralização pelo soro antibotrópico polivalente	73
Avaliação da neutralização pelo soro antibotrópico polivalente mais o tratamento com Laser baixa potência	73
Imunohistoquímica	74
RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR)	74
Método estatístico	76
<b>RESULTADOS NÃO PUBLICADOS</b>	<b>77</b>
3.3.1 Efeito do soro antibotrópico na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	77
3.3.2 Efeito do soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	79
3.3.3 Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	80
3.3.4 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia mecânica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	81
3.3.5 Efeitos do laser de baixa potência na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	83
3.3.6 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	84

3.3.7 Efeitos da neutralização pelo soro antibotrópico na resposta hiperalgésica térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	85
3.3.8 Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta nociceptiva térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	86
3.3.9 Efeitos do laser de baixa potência sozinho e combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	87
3.3.10 Efeito do LBP na ativação neuronal na medula espinal de camundongos submetidos à modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por veneno de <i>B. moojeni</i> .	88
3.3.11 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-1 $\beta$ após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	90
3.3.12 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	91
3.3.13 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	92
3.3.14 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	93
3.3.15 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B2 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	94
3.3.16 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	95
3.3.17 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 na medula espinal após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	96
3.3.18 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ em medula espinal após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	97
3.3.19 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 na medula espinal após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	98
3.3.20 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 na medula espinal após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	99
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>100</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>106</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>107</b>
<b>7. ANEXO</b>	<b>117</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

### **Artigo publicado na revista Photochemistry and Photobiology**

<b>Figura 1.</b> Efeito do tratamento com o LED na alodínia mecânica em camundongos	48
<b>Figura 2.</b> Efeito do tratamento com o LED na hiperalgesia mecânica em camundongos	49
<b>Figura 3.</b> Efeito do tratamento com o LED conjuntamente com o antiveneno na alodínia mecânica em camundongos	50
<b>Figura 4. Efeito do tratamento conjunto do LED com o soro antibotrópico</b> na hiperalgesia mecânica em camundongos	51

### **Artigo Submetido na revista Photochemical & Photobiological Sciences**

<b>Figura 1.</b> Formação do edema de pata induzido por MjTX-I ou II	66
<b>Figura 2.</b> Efeitos de LBP no edema de pata induzido por MjTX-I ou II	67
<b>Figura 3.</b> Efeitos do LED Vermelho e LED Infravermelho no edema de pata induzido por MjTX-I ou II	68
<b>Figura 4.</b> Efeitos do tratamento do LBP e AV na formação do edema induzido por MjTX-I ou II	69
<b>Figura 5.</b> Efeitos do tratamento do LED Vermelho e LED Infravermelho e AV na formação do edema induzido por MjTX-I ou II	70

### **Resultados ainda não publicados**

<b>Figura 1.</b> Efeito do soro antibotrópico na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	78
--	----

<b>Figura 2.</b> Efeito do soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	79
<b>Figura 3.</b> Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	80
<b>Figura 4.</b> Efeito do Laser conjuntamente com o soro antibotrópico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	82
<b>Figura 5.</b> Efeitos do laser de baixa potência na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	83
<b>Figura 6.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	84
<b>Figura 7.</b> Efeitos da neutralização pelo soro antibotrópico na resposta hiperalgésica térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	85
<b>Figura 8.</b> Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta nociceptiva térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	86
<b>Figura 9.</b> Efeitos do laser de baixa potência sozinho e combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia térmica após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	87
<b>Figura 10.</b> Efeito do LBP na ativação neuronal na medula espinal de camundongos submetidos à modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por veneno de <i>B. moojeni</i>	89
<b>Figura 11.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-1 $\beta$ após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> .	90
<b>Figura 12.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	91
<b>Figura 13.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	92
<b>Figura 14.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	93
<b>Figura 15.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B2 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	94
<b>Figura 16.</b> Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	95

- Figura 17.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni* 96
- Figura 18.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  em medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni* 97
- Figura 19.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni* 98
- Figura 20.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni* 99

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Protocolo de irradiação com LED (ARTIGO PUBLICADO).....	36
Tabela 2 - Protocolo de irradiação do LBP (artigo sbmetido) .....	56
Tabela 3 - Protocolo de irradiação do LED (artigo sbmetido) .....	56
Tabela 4 - Protocolo de irradiação com LBP (resultados não publicados) .....	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu\text{g}$  – Micro-grama  
 $\mu\text{L}$  – Micro-litro  
ATP- Adenosina Trifosfato  
cDNA – complementar Ácido desoxirribonucleico  
CK – Creatinoquinase  
COX-1 - Ciclooxygenase 1  
COX-2 – Ciclooxygenase 2  
DE – Densidadde de Energia  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DP – Densidade de Potênciia  
g- Grama  
GAAPDH – Desidrogenase de gliceraldeído-fosfato  
GaAs- Arseneto de Gálio  
GaAlAs – Arseneto de Gálio Alumínio  
HeNê – Hélio Neônio  
IASP - International Association for de study of pain  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama  
IL-1 $\beta$  - Interleucina -1 - beta  
IL-6 – Interleucina – 6  
IL-10 – Interleucina-10  
 $\text{J/cm}^2$  – Joule por centímetro quadrado  
LBP - Laser de Baixa Potência  
LED – Light Emitting Diode  
mg/Kg – Miligrama por Kilograma  
mL – Mililitro  
NMDA – N- metil D- Aspartato  
PBS - Phosphate Saline Buffer (tampão salina fosfato)  
PGE<sub>2</sub> . Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGs - Prostaglandinas  
TNF– Fator de necrose tumoral  
PAF- Fator Ativador de Plaquetas

PAG – Substância Cinzenta Periaquedatal  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro  
RT-PCR – Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real  
SNC – Sistema Nervoso Central  
VBM – veneno de *Bothrops moojeni*  
Via e.v – Via Endovenosa  
Via i.d.- Via intradérmica  
Via i.pl.- Via Intraplantar

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO:**

### **1.1 Acidente Botrópico e sinais clínicos**

Envenenamento por serpentes venenosas constituem um problema de saúde pública altamente relevante e negligenciado mundialmente, afetando especialmente as áreas rurais da América Latina, África e Ásia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). No Brasil, as serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos pertencem à família *Viperidae* do gênero *Bothrops*. O gênero *Bothrops* é de grande importância médica, social e científica, pelo fato de ser responsável por 90% do total de acidentes ofídicos no Brasil (BARRAVIERA, 1993).

Embora os venenos botrópicos apresentem variações quanto à composição e atividades biológicas, ao serem injetados em humanos ou animais, induzem um quadro fisiopatológico, caracterizado por reações locais imediatas e reações sistêmicas. As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na homeostasia, deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção do fibrinogênio. Podendo gerar sangramentos em ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância, como a gengivorragia (HATI *et al.*, 1999). As principais causas de óbitos no envenenamento botrópico estão relacionadas à insuficiência renal aguda (AMARAL *et al.*, 1985), sangramento em órgãos vitais e choque (KOUYOUMDJAIN *et al.*, 1991).

Dentre esses efeitos, o processo inflamatório é intenso e particularmente relevante, uma vez que é frequentemente seguido por dano tecidual local, levando à necrose com processo pobre de regeneração dos tecidos, com a ocorrência de sequelas permanentes associados à perda tecidual e disfunção, e suas consequentes implicações sociais e psicológicas (TREBIEN & CALIXTO, 1989).

Estudos experimentais têm evidenciado que a resposta inflamatória local induzida por venenos do gênero *Bothrops* é caracterizada por exsudação de proteínas plasmáticas, que causam a formação de edema (GALVÃO *et al.*, 2010; OLIVO *et al.*, 2007; COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; TREBIEN & CALIXTO, 1989). Além disso, Zamuner *et al.*, (2001) demonstraram que os venenos de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*, além de causarem a migração de células inflamatórias, são capazes de ativar várias funções microbicidas nestas células, como fagocitose e

liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Ademais, o recrutamento leucocitário acarretado pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* acompanha a liberação de mediadores inflamatórios tais como as citocinas interleucina-6, TNF- $\alpha$  e interferon-gama (ZAMUNER *et al.*, 2001; FARSKY *et al.*, 1997), bem como os mediadores lipídicos prostaglandina E<sub>2</sub> tromboxano A<sub>2</sub> e leucotrieno B<sub>4</sub> (ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; ZAMUNER *et al.*, 2001). 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 (ZAMUNER *et al.*, 2001). Ademais, foi demonstrado que a reação local inflamatória desencadeada pelo veneno botrópico é distinta dos demais processos inflamatórios por não ser modulada, em sua fase aguda, por glicocorticoides (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). Estes hormônios, dentre outras atividades, inibem a ativação de fosfolipases que são constituintes abundantes dos venenos botrópicos. A presença de dor é outro fenômeno frequente em picados por serpentes do gênero *Bothrops* sendo que a literatura demonstra que a hiperalgesia induzida por venenos botrópicos é mediada ao menos em parte por bradicinina, fosfolipases A<sub>2</sub>, leucotrienos e PAF (CHACUR *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 1994) e que os mastócitos contribuem para a hiperalgesia causada pelo veneno de *B. jararaca* (BONAVITA *et al.*, 2006). Usando células musculares em cultura e músculos isolados, Cintra-Francischinelli *et al.*, (2010) demonstraram que miotoxinas isoladas do veneno de *B. asper* induzem um rápido influxo de K<sup>+</sup> e ATP, os quais também são responsáveis pela dor forte, comumente relatada após picadas do gênero *Bothrops*.

### **1.2 *Bothrops moojeni***

A serpente *Bothrops moojeni* é a maior serpente das áreas de mata ciliar, das regiões central e sudoeste do Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2003). Em função do comportamento agressivo e porte avantajado, esta serpente é capaz de se adaptar aos ambientes modificados, tornando-se a principal espécie dos cerrados (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1989). Além disso, as serpentes dessa espécie são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem na região de São José do Rio Preto, no estado de São Paulo. Ainda, no estado de Minas Gerais, a cidade de Uberlândia e região a espécie *B. moojeni* apresentou a maioria dos casos de

envenenamento registrados no Hospital de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) entre 1984 e 1991 (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992). Os sinais clínicos desses acidentes mostram que os efeitos locais causados por essas serpentes, podem ser mais graves e com maior número de complicações do que daquelas causados pela serpente *Bothrops jararaca* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

O veneno da *B. moojeni* possui alta atividade proteolítica, contém uma variedade de enzimas, tais como L-amino ácido oxidase, fosfatase alcalina, fosfodiesterase, fosfolipase, hialuronidase, 5'- nucleotidase, peptidases, e metaloproteases (FERREIRA *et al.*, 1992; LEITE *et al.*, 1992; ASSAKURA *et al.*, 1985). O veneno desta espécie causa dano histológico e disfunção renal em ratos, e em células epiteliais renais em cultura (FERREIRA *et al.*, 1992; FURTADO *et al.*, 1991).

Quanto ao veneno de *B. moojeni*, não existem estudos suficientes na literatura relacionados à caracterização dos efeitos inflamatórios locais por ele causados, o que demanda a realização de estudos a este respeito.

Os relatos clínicos, relativos aos efeitos edematogênicos locais, causados pelo veneno da *B. moojeni*, demonstram sérias complicações (NOGUEIRA *et al.*, 2003). Neste sentido, Galvão *et al.*, (2010) demonstraram que o veneno da *B. moojeni* induz a formação de edema, que é mediado pela histamina, prostaglandinas e leucotrienos e que os mastócitos são fontes importantes desses mediadores para o início da inflamação local induzida por esse veneno. Apesar da importância médica, do acidente causado por esta serpente, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2003), os estudos relacionados à reação local inflamatória causada pelo veneno da *B. moojeni*, em particular o edema e dor, são escassos e incompletos justificando estudos adicionais.

A partir do veneno de *Bothrops moojeni* foram isoladas duas miotoxinas básicas com peso molecular de aproximadamente 13,5 KDa, a MjTX-I e a MjTX-II, são homólogas de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), essas miotoxinas apresentam uma lisina na posição 49 sendo classificadas de Lys-49 PLA<sub>2</sub>, essas miotoxinas não apresentam atividade catalítica em substratos artificiais, assim como atividades trombotica ou hemorrágica, no entanto são altamente mionecróticas e edematogênicas (SOARES *et al.*, 2004). Apesar da falta de atividade PLA<sub>2</sub> já foi demonstrado que essas miotoxinas desta classe induzem um processo inflamatório caracterizado por

aumento da permeabilidade vascular, migração celular e liberação de mediadores pro-inflamatórios, como a IL-1 e IL-6 (ZULIANI *et al.*, 2005).

É interessante que as miotoxinas isoladas de venenos botrópicos apresentam uma grande homologia sequencial e estrutural entre si. Essa característica, no entanto, não é suficiente para determinar atividades catalíticas e biológicas semelhantes.

### **1.3 Resposta Inflamatória aguda no envenenamento**

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção ou lesão dos tecidos, tendo como objetivo proteger o organismo contra uma agressão local do tecido conjuntivo. Após o desencadeamento da inflamação, observa-se uma primeira fase, denominada de fase aguda, caracterizada pelos sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda de função (para revisão ver GARCIA-LEME, 1989).

A resposta inflamatória aguda induzida pelo veneno botrópico apresenta sinais característicos de um quadro inflamatório agudo, que se caracteriza por três eventos principais: 1) alterações no calibre vascular, que levam ao aumento do fluxo sanguíneo; 2) mudanças estruturais na microvasculatura, permitindo que fluídos e proteínas plasmáticas, deixem a circulação, resultando em quadros álgicos e edematogênicos; 3) migração leucocitária da microcirculação e sua acumulação no foco da injúria (COLLINS, 1999).

Os eventos inflamatórios decorrem, em grande parte, da ação de mediadores inflamatórios pré-formados e armazenados em grânulos ou recém-sintetizados, que são liberados no decorrer da resposta inflamatória (GARCIA-LEME, 1989). Esses mediadores podem ser de origem plasmática (fatores do sistema complemento e cininas) ou celular (óxido nítrico, histamina, eicosanoides, serotonina, fator de ativador de plaquetas, neurocininas e citocinas) (LYONS, 1995).

A formação do edema ocorre devido a diversos eventos que ocorrem na microcirculação, iniciando com uma vasoconstricção, seguido da dilatação, do aumento do fluxo local e da permeabilidade vascular, ocorrendo extravasamento material proteico do plasma para o interstício. O efeito edematogênico ocasionado pelos venenos botrópicos, não foi atribuída a nenhuma proteína isolada, por se tratar, possivelmente, da somatória de efeitos de várias toxinas presentes nesses venenos. Estudos experimentais mostram evidências sobre a participação de toxinas

hemorrágicas (RODRIGUES *et al.*, 2001), proteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, componentes dos venenos de causam liberação de histamina de mastócitos e substâncias que ativam o sistema complemento (DIAS DA SILVA *et al.*, 1995; GUTIERREZ; LOMONTE, 1989). Outros autores demonstraram que o edema induzido pelos venenos da *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis* e *Bothrops asper* ocorre devido a ação de mediadores α e β adrenérgicos, fator de ativador de plaquetas (PAF), eicosanoides, além de serotonina e histamina (OLIVO *et al.*, 2007; TREBIEN; CALIXTO, 1989). Por outro lado, CHAVES *et al.* (1995) observaram a participação de eicosanóides e de mediadores α-adrenérgicos, mas não a de histamina e mediadores β-adrenérgicos no edema induzido pelo veneno de *B. asper* em camundongos. Ainda, foi demonstrado que o edema induzido pelos venenos de *B. asper* e *B. jararaca* aumentam os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> e que este aumento é via expressão de COX-2 (OLIVO *et al.*, 2007).

As lesões locais induzidas por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* têm sido investigadas, possibilitando o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos envolvidos na gênese destes fenômenos e a caracterização das substâncias presentes nestes venenos, responsáveis pelo quadro local. Entretanto, ainda há uma série de incógnitas com relação à patogênese destes efeitos, que ainda permanecem como um desafio a pesquisa toxinológica.

#### **1.4 Dor inflamatória**

A IASP- International Association for the Study of Pain – em 1986 definiu a dor como: “Uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada às lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. A dor contém um fator cognitivo e emocional e, é mediada pelo sistema nervoso, no entanto, clínica e experimentalmente se faz necessário à distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção (KANDEL *et al.*, 2003; MERKE e BOGDUK, 2003). É um sinal característico dos mecanismos normais de proteção do organismo contra o dano tecidual (DRAY, 1997).

A inflamação é por si só, um grande agente causador de dor. A liberação de mediadores gerados durante o processo inflamatório induz um aumento da atividade dos nociceptores, o que se traduz em dor inflamatória (LEVINE e REICHLING, 1999). Esses mediadores podem agir direta ou indiretamente sobre os receptores para

dor (nociceptores), conjuntamente com a formação de edema local e lesão dos feixes nervosos periféricos sensitivos (DRAY; PERKINS, 1993).

O início da propagação da dor é dado pela geração de potenciais de ação nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, classificadas como fibras C e A $\delta$ , que possuem receptores específicos para a dor, denominados nociceptores. Os nociceptores são normalmente ativados por estímulos de intensidade lesiva de origem mecânica, térmica ou química (ALMEIDA *et al.*, 2004; RIEDEL E NEECK, 2001). Os neurônios aferentes primários, uma vez ativados, fazem conexões, diretas ou indiretas, com neurônios intrínsecos na coluna posterior da medula espinal (CPME) classificados como: a) neurônios de projeção, que levam a informação nociceptiva para centros superiores do cérebro; b) interneurônios excitatórios, que levam os impulsos sensoriais para os neurônios de projeção; ou c) interneurônios inibitórios, que regulam o fluxo de informação nociceptiva para os centros superiores (JESSEL, 1991).

Na medula espinal, a transmissão nociceptiva envolve ainda a participação de canais iônicos (ALTIER E ZAMPONI, 2004), expressos nos neurônios sensoriais, sendo que a ativação de alguns destes gera correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular causando excitação ou inibição neuronal. Os principais canais envolvidos nesse processo são os canais de sódio, os canais de cálcio dependentes de voltagem e os canais de potássio (LEE *et al.*, 2005).

Da medula, a informação nociceptiva é levada para estruturas do tronco encefálico e diencéfalo, por diferentes vias ascendentes, pelos neurônios de projeção (MILLAN, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espinoreticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais proeminente na condução do impulso nocivo (JESSEL, 1991). A via espinotalâmica projeta-se para os núcleos talâmicos ventrais póstero-lateral (VPL) e ventral póstero-medial (VPM), envolvidos com os componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e para os núcleos talâmicos inespecíficos (centromedial, centrolateral, láteroventral e intralaminares), relacionados com os componentes afetivos da dor.

O dano tecidual provoca uma cadeia de eventos que estão intimamente ligados ao processo inflamatório. Durante este processo, a liberação dos mediadores químicos é capaz de modular a resposta inflamatória e interferir com a atividade de fibras nervosas sensitivas aferentes. Esta interferência é mediada pela ligação de

substâncias em receptores específicos expressos nas fibras sensitivas, e/ou ativação de mensageiros secundários, induzindo a hiperalgesia (FERREIRA *et al.*, 1993). A hiperalgesia é causada pela sensibilização dos nociceptores, e envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, pela ação de mediadores químicos, quanto à facilitação central (corno dorsal da medula e tálamo) da transmissão sináptica nervosa (DRAY, 1994). Muitos mediadores provêm de tecidos lesionados e adjacentes, de leucócitos circulantes e plaquetas, endoteliais vasculares, células imunes residentes nos tecidos (incluindo mastócitos) e fibras sensoriais simpáticas (LEVINE e REICHLING, 1999), entre os mediadores químicos estão: metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina, dopamina e óxido nítrico), peptídeos (cininas, taquicininas entre outros), proteínas (fator de crescimento do nervo), que são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão dolorosa, tanto no sistema nervoso periférico, quanto no central (CALIXTO *et al.*, 2000; BESSON, 1999; FÜRST, 1999). Além da estimulação das fibras sensitivas pelos mediadores químicos, a liberação de radicais livres, o edema e a alteração do pH local, proporcionados pela inflamação, são fatores de interferência na atividade das fibras nervosas (DRAY, 1994).

As células da glia da medula espinal, por meio de liberação de mediadores nociceptivos, têm papel relevante para a transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (WATKINS & MAIER, 2003; WATKINS *et al.*, 2001; BARRES 1991). A glia é formada pela macroglia (oligodentrócitos e astrócitos) e pela microglia (HAYDON, 2001). Evidências recentes têm demonstrado a existência de interação entre astrócitos e neurônios (PEREA & ARAQUE, 2002; ARAQUE *et al.*, 2001) através de estudos empregando células em cultura mostraram que neurotransmissores liberados por neurônios induzem, nos astrócitos, aumento dos níveis celulares de  $\text{Ca}^{++}$ , com consequente liberação de glutamato. Este glutamato liberado modula a excitabilidade neuronal e o aumento da transmissão sináptica (HAYDON, 2001). Os oligodentrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras nervosas no SNC e podem ser considerados como equivalente às células de Schwann no sistema nervoso periférico. A microglia é o primeiro tipo de célula a responder a diversos tipos de injúria. A ativação microglial envolve um padrão de resposta celular estereotipado, com proliferação e recrutamento celular para o local da lesão,

aumento da expressão de imunocélulas e mudanças funcionais, incluindo a liberação de mediadores citotóxicos e/ou inflamatórios (COLBURN & DELEO, 1999).

As células da glia sintetizam várias substâncias dentre elas as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o óxido nítrico, quimiocinas e citocinas (STELLA *et al.*, 1994).

Dados na literatura têm demonstrado que a glia (astrócitos e microglia), além da participação em processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos nociceptivos (MILLIGAN *et al.*, 2003; WATKINS & MAIER, 2003). Assim, tem sido evidenciada a participação das células gliais na hiperalgesia induzida por processos inflamatórios periféricos.

#### **1.4.1 Marcação neural e nocicepção**

A análise da expressão da proteína Fos tem sido utilizada em estudos das bases neurais da nocicepção. Há aproximadamente uma década, Hunt *et al.*, (1987) descreveram a expressão do gene *c-fos* e seu produto proteico, a proteína Fos, em neurônios do corno dorsal da medula espinhal, lombar, de ratos, submetidos à estimulação nociva.

A ativação da proteína Fos se dá pelos mais diversos estímulos, como, por exemplo, a despolarização de neurônios (MORGAN; CURRAN, 1986), epilepsia, estresse (DEL BEL *et al.*, 1993) e estímulo nociceptivo (HARRIS, 1996), podendo estar envolvida em vários processos fisiológicos.

A descoberta do gene *c-fos* e de seu produto de transcrição, a proteína Fos no sistema nervoso central após estimulação nociva periférica (HUNT *et al.*, 1987) tornou possível buscar informações sobre as vias neurais envolvidas na nocicepção, e sua expressão tem sido utilizada no mapeamento de vias nociceptivas e na investigação dos fatores que modulam suas atividades (HERDEGEN E LEAH, 1998; HARRIS, 1996). A literatura demonstra que estímulos nocivos de natureza mecânica, química ou térmica do membro posterior ou da cauda ou ainda a estimulação elétrica de fibras do tipo C do membro posterior de ratos, resultam em distribuição bilateral similar de células imunorreativas à proteína Fos em diversas regiões do SNC (HERMANSON E BLOMQVIST, 1996; BULLIT, 1990). Sua expressão tem início entre 1 e 2 horas após o estímulo, e atinge um pico após 2 horas nas lâminas I e II da medula espinal, ipsilateralmente à estimulação nociva (HUNT *et al.*, 1987). Depois de decorridas 8

horas do estímulo é possível observar uma marcação nas lâminas profundas V, VI, VII e X com um pico após 16 horas. Ainda a distribuição de Fos no cérebro ocorre de maneira similar ao que é considerado o sistema central da dor, após diferentes estímulos nociceptivos (HARRIS, 1996; LANTERI-MINET, 1993; PERTOVAARA *et al.*, 1993; HONKANIEMI, 1992; BULLIT, 1990). Ainda, o aumento da expressão de Fos, é observado em diferentes áreas do encéfalo e medula espinal, tanto após estimulação elétrica de fibras nociceptivas quanto após a indução de inflamação aguda e crônica (BURITOVA *et al.*, 1995; LANTERI-MINET *et al.*, 1993; HERDEGEN *et al.*, 1991). Alguns estudos sugerem uma correlação direta entre nocicepção e expressão de Fos uma vez que a antinocicepção, via opioides, observada no teste da formalina, é acompanhada proporcionalmente da inibição de Fos na medula espinal (GOGAS *et al.*, 1991). Ainda, sua expressão em neurônios espinais, frente à estimulação nociva periférica, é suprimida por drogas analgésicas e modulada por N-metil D-Aspartato (NMDA) e óxido nítrico sintase (HARRIS, 1998).

Foi demonstrado que estímulos dolorosos de diferentes origens e intensidades induzem respostas distintas no que se refere à expressão Fos em diferentes áreas do sistema nervoso. Nesse sentido, observou-se que a expressão de Fos ocorre de maneira distinta nas colunas lateral ou dorsal da PAG (Substância cinzenta periaquedatal) e em diferentes áreas da medula espinal, dependendo do tipo e intensidade de estímulo doloroso aplicado (LUMB, 2002; KEAY *et al.*, 2001) foi também demonstrada somatotopia na expressão de Fos em diferentes áreas da medula espinal frente a estimulação nociva em diferentes áreas do mesmo membro (MINETA *et al.*, 1995; ALOISI *et al.*, 1993; BULLITT, 1991).

## **1.5 Soroterapia**

O tratamento preconizado para o acidente botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico. Devido à eficiência dos antivenenos, os coeficientes de letalidade, decorrentes desses acidentes, têm revelado tendência decrescente ao longo do tempo. No entanto, os efeitos locais são dificilmente antagonizados. Estudos experimentais têm sugerido que existe uma significante, embora parcial, neutralização da hemorragia, edema e mionecrose local apenas quando o antiveneno é administrado rapidamente após o envenenamento (CHAVES *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ, 1988). Neste sentido, Camey *et al.* (2002), estudaram o efeito

farmacológico do veneno de cinco espécies botrópicas brasileiras em relação à sua letalidade, atividade hemorrágica, necrosante, proteolítica da fosfolipase, coagulante e fibrinolítica. Os resultados indicaram que o antiveneno foi efetivo na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. Porém, os efeitos locais não foram neutralizados pelo uso de antiveneno e os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, até o momento, não foram esclarecidos.

No caso do veneno de *B. moojeni*, o edema é um achado comum que é frequentemente seguido de pressão intracompartmental levando a síndrome compartmental. Essa reação local e a mionecrose não são previnidas, mesmo quando, uma grande quantidade de antiveneno é administrada 3 horas depois do acidente (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1988).

No Brasil, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia já existente, com o propósito de diminuir a miotoxicidade local, como terapias que combinam o uso da soroterapia à aplicação de extratos de plantas medicinais (PEREIRA *et al.*, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2007; ESMERALDINO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005) e substâncias como heparina e polianions (ROSTELATO-FERREIRA *et al.*, 2010). Entretanto, qualquer que seja a abordagem terapêutica até hoje disponível, esta tem se mostrado ineficaz na neutralização dos efeitos locais causados pelo veneno botrópico, os quais são de evolução rápida e intensa. Pôr esses motivos a procura pôr abordagens alternativas às usualmente empregadas tem sido motivo de interesse e se constituem em medidas extremamente relevantes para neutralização e/ou diminuição dos efeitos degenerativos, bem como a aceleração do processo regenerativo. Outra possibilidade que começa a ser investigada é a utilização de laserterapia.

## **1.6 Terapia com laser de baixa potência**

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

Geralmente a extensão da interação entre lasers e os tecidos é determinado pelo comprimento de onda de luz laser, pelas características ópticas de cada tecido, pela

densidade de potência (irradiância), energia total entregue sobre a área da superfície irradiada (densidade de energia), duração da exposição e o modo de entrega da energia para o tecido alvo (TUNER; HODE, 2002; BAXTER, 1997; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

A luz laser ao incidir em um meio, pode ser refletida, espalhada, transmitida ou absorvida. O laser fornece uma quantidade elevada de fótons que em parte são: refletidos, dispersos e transmitidos ao atingir o tecido biológico e o restante é absorvido em diferentes camadas da epiderme e da derme, de acordo com os constituintes de cada camada. Para que a radiação laser produza um efeito terapêutico no corpo humano, é necessário que ela seja absorvida para que ocorra a interação com as estruturas moleculares e celulares (MELLO & MELLO, 2001; GENOVESE, 2000; BRUGNERA JUNIOR; PINHEIRO, 1998).

A aplicação do laser de baixa potência (LBP) têm como finalidade restabelecer o equilíbrio biológico celular melhorando as condições de vitalidade tecidual. Assim, esses lasers são reconhecidos por sua ação analgésica, biomoduladora e antiinflamatória sobre tecidos duros e moles produzido por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ao invés de efeitos térmicos (MELLO & MELLO, 2001; BELKIN *et al.*, 1988). O LBP age principalmente sobre as organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento de ATP (Trifosfato de Adenosina) e modificando o transporte iônico. Acredita-se que existam fotorreceptores sensíveis a determinados comprimentos de ondas, que ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Desta maneira o LBP acelera, em curto prazo, a síntese do ATP (glicose e oxidação fosforilativa) e em longo prazo a transcrição do DNA (KARU, 1989) e ainda, favorece a produção de ácido araquidônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, justificando sua ação antiedematosa e anti-inflamatória (MESTER *et al.*, 1985), promove aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando o efeito analgésico na dor não inflamatória (CAMPANA *et al.*, 1998).

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBP sobre as células e tecidos, vale ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação do laser sobre os tecidos biológicos, ainda não são conclusivas, portanto estudos adicionais são necessários.

### **1.7 Terapia com LED**

O LED (Light Emitting Diode) é um dispositivo semicondutor que quando polarizado adequadamente emite luz monocromática e não coerente, na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes (ZANIN, 2002). O LED caracteriza-se por necessitar de menos energia para emissão do comprimento de onda desejado. Segundo alguns autores, a terapia com o LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a terapia a laser de baixa potência (KARU *et al.*, 2003; ZANIN, 2002). O aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, tem sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz. O processo de absorção luminosa por cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir um pacote energético específico para que promova reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular (KARU *et al.*, 2003).

Os LEDs podem ser usados na Fisioterapia (dores musculares crônicas e agudas), na Odontologia (tecidos inflamados, úlcerações, entre outros), na Dermatologia (redução de edemas, úlcera e dermatites), e muitas outras especialidades (EL SAYED; DYSON, 1990). São aplicados diretamente na área lesada ou em vários pontos do corpo.

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

### **1.8 Fotobioestimulação e acidente ofídico**

A literatura ainda é escassa sobre os efeitos do laser de baixa potência sobre a reação local causado por veneno ofídico. Dourado, *et al.* (2003) , estudaram o efeito da irradiação laser em mionecrose, no músculo gastrocnêmio de camundongos, causado pela injeção intramuscular de veneno de serpente *B. moojeni*. Esses autores observaram que o tratamento com esse laser diminuiu consideravelmente a mionecrose, inibindo a habilidade do veneno de desfazer a integridade da membrana

plasmática. Estudos realizados por nosso grupo demonstram que o tratamento com o laser e LED aplicados 30 min e 3 h após a injeção do veneno de *B. moojeni* e por duas miotoxinas isoladas deste veneno foram efetivos na redução do edema e hemorragia (NADUR-ANDRADE *et al.*, 2011). Ademais, outros estudos realizados por nosso grupo demonstram que o laser de baixa potência reduz o edema causado pelo veneno de *B. jararacussu* em modelo de inflamação muscular. Além disso, o tratamento conjunto do laser com o antiveneno botrópico potencializa o efeito observado com o laser por si só, reduzindo o efeito edematogênico do veneno de *B. jararacussu* (BARBOSA *et al.*, 2008). Ainda, demonstramos que o laser de baixa potência, além de inibir o edema e a amigração de leucócitos, também reduziu a alodínia e a hiperalgesia causada pelo veneno de *B. jararacussu* (GUIMARÃES-SOUZA *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que a fotobioestimulação possa ser uma alternativa a mais para o tratamento de acidentes com serpentes botrópicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito terapêutico do laser de baixa potência (LBP) e LED sobre o edema e hiperalgesia inflamatória causada pelo veneno de *Bothrops moojeni* e por duas miotoxinas isoladas deste veneno em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

**2.2.1** Caracterizar a reação edematogênica induzida por duas miotoxinas (MjTX-I e MjTX-II) isoladas do veneno *Bothrops moojeni*, em camundongos, quanto:

- a formação do edema podal (cinética);
- à neutralização do edema podal pelo soro antibotrópico polivalente;

**2.2.2** Avaliar a eficácia do LED Vermelho, LED Infravermelho e LBP no edema podal induzido pelas miotoxinas sozinho ou conjuntamente com o soro antibotrópico.

**2.2.3** Padronizar o modelo de hiperalgesia inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni* por meio da avaliação da sensibilidade cutânea por filamentos de Von-Frey e térmica pelo teste plantar;

**2.2.4** Avaliar a eficácia do soro antibotrópico frente à sensibilidade dolorosa;

**2.2.5** Avaliar o efeito do LBP e do LED Vermelho e Infravermelho sobre a hiperalgesia e alodínia induzidas pelo veneno;

**2.2.6** Avaliar o efeito do tratamento conjunto do LBP ou do LEDs com o soro antibotrópico sobre a hiperalgesia e alodínia induzidas pelo veneno;

**2.2.7** Avaliar o efeito do tratamento com LBP sobre a ativação neuronal na medula espinal dos animais por imunohistoquímica;

**2.2.8** Avaliar o efeito do tratamento com LBP sozinho ou conjuntamente com o soro antibotrópico sobre a expressão de RNm de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ), e receptores de bradicinina B1 e B2 no músculo plantar e medula espinal dos animais por PCR em tempo real.

### **3. RESULTADOS**

**3.1 Artigo publicado na revista Photochemistry and Photobiology, 90: 207–213, 2014.**

#### **Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on *Bothrops moojeni* Venom-Induced Hyperalgesia**

Nikele Nadur-Andrade<sup>1</sup>, Stella R. Zamuner<sup>1</sup>, Elaine F. Toniolo<sup>2</sup>, Carlos J. de Lima<sup>3</sup>, José C. Cogo<sup>4</sup> and Camila S. Dale<sup>\*2,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Sírio-Libanês Hospital, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Biomedical Instrumentation, Camilo Castelo Branco University, São José dos Campos, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratory of Inflammation, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraiba, São José dos Campos, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Received 19 March 2013, accepted 11 October 2013, DOI: 10.1111/php.12189

#### **ABSTRACT**

Envenoming induced by *Bothrops* snakes is characterized by drastic local tissue damage involving hemorrhage, myonecrosis and prominent inflammatory and hyperalgesic response. The most effective treatment is antivenom therapy, which is ineffective in neutralizing the local response. Herein, it was evaluated the effectiveness of light-emitting diode (LED) at wavelengths of 635 and 945 nm in reducing inflammatory hyperalgesia induced by *Bothrops moojeni* venom (BmV) in mice, produced by a subplantar injection of BmV (1 µg). Mechanical hyperalgesia and allodynia were assessed by von Frey filaments at 1, 3, 6 and 24 h after venom injection. The site of BmV injection (1.2 cm<sup>2</sup>) was irradiated by LEDs at 30 min and

3 h after venom inoculation. Both 635 nm (110 mW, fluence of 3.76 J/cm<sup>2</sup> and 41 s of irradiation time) and 945 nm (120 mW, fluence of 3.8 J/cm<sup>2</sup> and 38 s of irradiation time) LED inhibited mechanical allodynia and hyperalgesia of mice alone or in combination with antivenom treatment, even when the symptoms were already present. The effect of phototherapy in reducing local pain induced by BmV should be considered as a novel therapeutic tool for the treatment of local symptoms induced after bothropic snake bites.

## INTRODUCTION

Snake envenomation presents a threat to public health in tropical countries. In South America, snakes of the genus *Bothrops* are responsible for the majority of snakebites (1, 2). Patients bitten by *Bothrops* snakes manifest systemic signs of envenomation, such as hemostatic disturbances, and signs at the site of bite, for example hemorrhage, myonecrosis, dermonecrosis and inflammatory reactions-such as edema, leukocyte infiltration and hyperalgesia (3, 4). *Bothrops moojeni* is a venomous snake responsible for most of the snakebites in the central region of Brazil (5). Despite the medical importance, there are only a few studies related to the local inflammatory reaction caused by this venom. In this sense, the literature shows that in the accidents caused by these snakes serious local complications occur such as a prominent edema formation, intense pain, swelling and pallor which may develop into more severe results such as muscle mass loss, neuropathy and amputation (6).

So far, the most effective treatment for *Bothrops* snakebites accidents is the antivenom therapy. While antivenins (AV) are efficient in reversing systemic alterations in snakebite envenomations, its administration does not prevent local effects and resultant disabilities. Consequently, there is a need to find therapeutic approaches that are able to complement AV in the neutralization of local tissue damage to minimize or prevent the progression to a severe clinical status observed after *Bothrops* snakebites (7, 8). Thus, it is important to develop therapies that may be associated with AV treatment that can be effective in reducing the local effects by *Bothrops* snakes envenoming. In this scenario, phototherapy emerges as an important tool in the treatment of local reactions caused by bothropic venoms. In this sense it has been recently demonstrated that laser treatment decreases myonecrosis, edema

and leukocyte influx of the gastrocnemius muscle of mice injected with *B. jararacussu* venom (8–10).

Positive effects of light-emitting diode (LED) phototherapy have been demonstrated on certain skin disease (11–14), in wound healing (15), in the treatment of retinal injury (16), in the reduction in wounds in diabetic rats (17), in chronic venous ulcers (18), in mucositis (19) and as an anti-inflammatory tool (20). LED reduction in pain has also been demonstrated (21). Experimentally it has been demonstrated that LED inhibits hyperalgesia and edema formation in an experimental model of zymosan-induced arthritis in mice (22), reduces signs of inflammation in collagenase-induced tendinitis in rats (23) and prevents muscle damage and local inflammation after exercise in an experimental model of exercise-induced muscle damage in rats (24).

Although its mechanism of action is still unknown, results suggest that during phototherapy treatment, both visible and near infrared photons are absorbed by chromophores within the cells, resulting in increased production of cellular energy, which leads to normalization of cell function, pain relief and healing (25, 26). Considering the mechanisms by which phototherapy inhibits inflammatory response, it is demonstrated, in human gingival fibroblasts, that 635 nm irradiation, can directly dissociate the reactive oxygen species (ROS) leading to the inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase (COX-2) expression, thus inhibiting prostaglandin E<sub>2</sub> release (27), and this effect involves the participation of nuclear factor-kappa B (NF-KB) (28). Similar results were observed in an experimental model of muscle damage where the inhibition of inflammatory response by 808 nm irradiation occurs through a mechanism involving NF-kB and COX-2 (29). The involvement of NF-kB in the anti-inflammatory effect of low-level laser therapy have been reported in other experimental models (30–32), thus reinforcing its participation in the anti-inflammatory effect of phototherapy.

We have previously reported that laser and LED treatment significantly reduces the edema formation and hemorrhage induced by *B. moojeni* snake venom (33). We also demonstrated that low-level laser therapy was efficient in reducing *B. jararacussu*- induced hyperalgesia (34). However, the analgesic effect of LED has not yet been demonstrated after venom injection. Although there are few data in the literature on the use of LED therapy in the treatment of snakebites, this may be an effective treatment to neutralize the local effects caused by *Bothrops* snake

envenomation. In this study, we evaluated the effects of LED treatment on the outcome of *B. moojeni*-induced hyperalgesia and allodynia in mice.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** The experiments were carried out with male Swiss mice 45 days of age weighing 22–25 g. Animals were kept in plastic cages with water and food *ad libitum* and maintained under a controlled temperature on a 12-h light/dark cycle. Mice were divided into experimental groups of five animals each. For the experiments, the animals were handled considering the principles and guide use of laboratory animals involving pain and nociception (35), and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA2010/01) of the Hospital Sírio-Libanês.

**Venom and antivenom.** *Bothrops moojeni* venom (BmV) was supplied by the Serpentarium of the Center of Studies of Nature at UNIVAP. The BmV was lyophilized, kept refrigerated at 4°C and diluted in sterile saline solution (0.9%) immediately before use. BmV was injected into the subplantar surface of the right hind paw at the concentration of 1.0 µg/ 50 µL. The equine antivenom (AV) used in the experiments was a polyvalent *Bothrops* AV (lot# MS122340007) raised against a pool of venom from *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. cotiara*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*, and was obtained from the Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil). AV was injected through the intravenous route (0.2 µL of AV diluted in saline; final volume of 50 µL—considering that 1 mL of AV neutralizes 5 mg of Bothropic venom (36) 30 min after BmV injection.

**Mechanical hyperalgesia and tactile allodynia.** Hyperalgesia and allodynia of the hind paw were assessed as described by Takasaki et al. (37). Mice were placed individually in plastic cages and 15 min later injected into the subplantar surface of the right hind paw with 1.0 µg of crude BmV diluted in 50 µL of sterile saline, or with the same volume of sterile saline. von Frey filaments with bending forces of 0.407 g (3.61 filament - allodynia stimulus), 0.692 g and 1.202 g (3.84 and 4.08 filaments - hyperalgesia stimulus) were pressed perpendicularly against the plantar skin and held for 5 s, at 1, 3, 6 and 24 h after venom injection. The stimulation of the same intensity was applied three times to each hind paw at intervals of 5 s. The responses to these stimuli were ranked as follows: 0, no response; 1, move away

from von Frey filament and 2, immediate flinching or licking of the hind foot. The nociceptive score was calculated as follows:

$$\text{Nociceptive score (\%)} = \frac{\Sigma \text{ (average score of each animal)}}{2 \times \text{number tested animals}} \times 100$$

**Light source, dose and treatment.** A LED device (model Super Red LED-RL5-R3545; Super Bright LEDs, St. Louis, MO) was used for irradiation. The LED parameters, low enough to avoid any thermal effect, were chosen on the basis of previous studies (9, 10). The LED radiation was applied to the same area as the injection of BmV or saline solution. A control group was treated using the same experimental procedure but with the LED turned off. Animals were irradiated 30 min and 3 h after subplantar injection. The experimental parameters for the LED are presented in Table 1 following Jenkins *et al.* (38).

**Statistical analysis.** Results are presented as mean ± standard error of mean. Statistical evaluation of data was carried out by one way analysis of variance (ANOVA) and sequential differences among means were analyzed by Tukey test (Instat 3.01, GraphPad Software Inc, USA). Differences in results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

**Table 1. LED parameters**

Wavelengths(nm)		
Mean power output (mW)	110	120
Power density (m W/cm <sup>2</sup> )	0.092	0.100
Beam area (cm <sup>2</sup> )	1.2	1.2
Fluence (J/cm <sup>2</sup> )	3.76	3.8
Energy (J)	4.51	4.56
Energy density (J/cm <sup>2</sup> )	3.8	3.8
Anatomical location	Subplantar/ hind paw	Subplantar/ hind paw
Number of treatments	2	2
Interval between treatments	2 h 30 min	2 h 30 min
Irradiated area (cm <sup>2</sup> )	1.2	1.2
Irradiation time per point(sec)	41	38

A LED device (model Super Red LED-RL5-R3545; Super Bright LEDs, St. Louis, MO) was used for irradiation.

## RESULTS

Animals injected with *Bothrops moojeni* venom (BmV) showed significant allodynia when compared with baseline measures taken before the test, as indicated by increased basal threshold in response to stimulation by von Frey filaments. Allodynia was observed from the 1st h after BmV injection up to 24 h (Fig. 1A, B). Treatment with 635 nm LED applied 30 min and 3 h after BmV injection reversed the observed allodynia at the 3rd and 6th hours of treatment (Fig. 1A). On the other hand, treatment of animal with the 945 nm LED did not change BmV-induced allodynia (Fig. 1B).

Regarding mechanical hyperalgesia, injection of BmV caused significant increase in the nociceptive score from the 1st h after BmV injection up to 24 h after injection for both 3.84 and 4.08 von Frey filaments (Fig. 2). Treatment with 635 nm LED reversed the observed hyperalgesia for both filaments. For the 3.84 filament the inhibition of nociceptive behavior was significant for all evaluated times (Fig. 2A). For the 4.08 filament, the inhibition of nociceptive behavior was significant at the 3rd hour up to 24 h of evaluation (Fig. 2B). Similar results were observed for the 945 nm LED. However, for the 3.84 filament, besides the reversion of hyperalgesia at 3, 6 and 24 h, a partial inhibition of the nociceptive behavior at the 1st hour of evaluation was also observed (Fig. 2C). On the other hand, treatment with 945 nm LED induced only a partial reversion of nociception for the 4.08 filament (Fig. 2D).

The most effective treatment for venomous snakebites accidents is antivenom therapy, which although effective in neutralizing the systemic effects of envenomation, it does not neutralize the severe local effects induced by these accidents (8). As treatment with both 635 and 945 nm LED was effective in inhibiting painful response of animals after BmV injection, we evaluated its effect concomitant with antivenom (AV) treatment. AV treatment did not interfere with mechanical allodynia of mice when compared with control group or with animals injected with BmV (Fig. 3A, B). Concomitant treatment of AV with 635 nm LED was effective in inhibiting mechanical allodynia of mice similarly to that observed when animals were treated only with the LEDs (Fig. 3A). Also, for the 945 nm LED, once again, no changes on nociceptive score were observed (Fig. 3B).

Surprisingly, regarding mechanical hyperalgesia, when animals received AV concomitant with 635 nm LED a decrease in analgesic effect was observed for the

1st and 3rd h of treatment were only a partial reversion of hyperalgesia was detected when the 3.84 von Frey filament was evaluated (Fig. 4A). Moreover, for the 945 nm LED the loss of effect was detected for all evaluated times, in which case it was detected only as a partial reversion of mechanical hyperalgesia of mice at all evaluated times (Fig. 4C). Finally when 4.08 von Frey filament was evaluated, a loss of analgesic effect was observed for 635 nm LED for the 6th and 24th h of evaluation (Fig. 4B). Interestingly concomitant treatment of animals with AV and 945 nm LED completely inhibited mechanical hyperalgesia when the mice were evaluated with 4.08 von Frey at all evaluated times (Fig. 4D).

## DISCUSSION

In recent years, a great amount of attention has been directed toward the benefits of phototherapy as a treatment modality for reducing pain, inflammation and edema, promoting healing of wounds, deeper tissues and nerves, and preventing cell death and tissue damage (39). Although the biochemical mechanisms underlying the positive effects of phototherapy are incompletely understood, the literature demonstrates that photobiostimulation can be an effective alternative to drugs. Light-emitting diode (LED) photomodulation is a novel category of nonthermal lightbased treatment designed to modulate cellular activity (40).

We showed here that LED treatment is effective in inhibiting both allodynia and hyperalgesia induced by *Bothrops moojeni* (BmV) venom, in mice. LED treatment was applied 30 min and 3 h after venom injection, to assess if LED could exert a beneficial effect even after the symptoms of envenomation become evident, as the intervention, in health centers, usually occurs only after several hours of the occurrence of the bite. The ability that venoms from Bothrops snakes have to induce acute inflammatory process, have been reported by several authors (3,41). Herein, we demonstrate that the BmV was able to induce both mechanical allodynia and hyperalgesia in mice from the 1st h after injection remaining for at least 24 h. These data corroborate with data from literature demonstrating that the venoms of *B. asper* and *B. jararaca* snakes induce time-dependent mechanical hyperalgesia in rats (41–43).

In this study we used two different LED wavelengths: one in the red region (635 nm) and the other in the near-infrared region (945 nm), both with a density of

energy  $3.8 \text{ J/cm}^2$ . The choice of these parameters was based on the literature that demonstrates that LED irradiation is more effective around the red and infrared range (44). Results presented herein demonstrate that 635 nm LED, but not 945 nm LED, was able to inhibit mechanical allodynia in all evaluated times. Regarding hyperalgesia, both 635 and 945 nm LED were able to inhibit nociceptive behavior, however, 635 nm was more effective. These data are in accordance with data from literature demonstrating that laser treatment (at wavelength of 685 nm,  $2.2 \text{ J/cm}^2$ ) inhibits hyperalgesia induced by *B. jararacussu* venom (34). One explanation of the fact that 635 nm LED was more effective than 945 nm LED could be the depth of light penetration, as the 635 nm light is absorbed more quickly than 945 nm light (45). The literature shows that the analgesic effect caused by low-level laser does not involve the participation of peripheral opioid receptors, but involves later events of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) release during the acute inflammation (46). Also, it was demonstrated that *B. asper* and *B. jararaca* venom increase the release of PGE<sub>2</sub> via COX-2 expression (47). Therefore, the inhibition of PGE<sub>2</sub> by LED could be, in our model, an important mechanism by which the phototherapy reduces the nociceptive behavior induced by *B. moojeni* venom, a hypothesis that needs to be addressed in future studies.

The most effective treatment for Bothrops snakebites is antivenom (AV) therapy which is very efficient in reversing venom-induced systemic effects characterized by disturbances in homeostasis, deficiency in clotting, abnormal platelet aggregation and fibrinogen depletion (48). However, AV neutralization of venom-induced local effects is difficult owing to the rapid development of tissue damage after envenomation. As a consequence, local tissue damage leading to necrosis is particularly relevant, as it is frequently followed by poor tissue regeneration, with the occurrence of permanent sequelae associated with tissue loss and dysfunction (49–51). For this reason, we also evaluated the effect of LED associated with AV therapy. Our results demonstrate that association with antivenom did not modify the effects of 635 nm LED on allodynia. However, considering hyperalgesia, a loss of effect was observed for both 635 nm and 945 nm LED when associated with antivenom therapy. This is an intriguing result as it was shown that laser therapy treatment associated with AV therapy is more effective in reducing edema in the gastrocnemius muscle after the injection of *B. jararacussu* venom when compared with either laser therapy or AV alone (9). This loss of effect could be

explained by the fact that antivenoms are constituted by antibodies from immunized animals; hence, the use of heterologous proteins for human treatment involves the possibility of adverse reactions due to activation of the immune system (51). Moreover, snake venom is also a foreign antigen and can generate an immune response by itself. Therefore, one hypothesis to explain the loss of antinociceptive effect could be the presence of adverse effects that could affect the nociceptive response of animals. Another hypothesis could be that LED treatment has dissociated mechanisms for nociceptive and inflammatory response induced by the venom. This hypothesis also needs to be addressed in future studies.

Taken together results presented herein demonstrate that *B. moojeni* venom effect is able to induce mechanical allodynia and hyperalgesia in mice. Moreover, LED therapy is effective in reducing both allodynia and hyperalgesia induced by BmV even though the radiation was administered after the symptoms were already present, suggesting that phototherapy reduces local effects induced by BmV and therefore may be clinically relevant. Another interesting finding is the fact that although AV treatment reduces the effect of LED, it is still able to reduce the painful behavior of animals reinforcing the therapeutic role of LED in the treatment of patients injured by *Bothrops* snakes. Thereby, treatment with LED should be considered as a therapeutic approach for the treatment of local effects of *Bothrops* poisoning.

## CONCLUSION

Both 635 and 945 nm LED are effective in inhibiting nociceptive behavior induced by *Bothrops moojeni* venom in mice.

*Acknowledgements* - NNA is recipient of FAPESP PhD fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2012/09710-8); SRZ is recipient of CNPq-PQ grant. This work was supported by FAPESP (08/02297-2), Hospital Sírio-Libanês and Nove de Julho University (UNINOVE).

## REFERENCES

1. Warrell, D. A. (1996) Clinical features of envenoming from snake bites. In Envenomings and their treatments, (Edited by C. Bon and M. Goyffon), pp. 63–76. Editions Fondation Marcel Mérieux, Lyon.
2. Chippaux, J. P. (1998) Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organ. 76, 515–524.
3. Rosenfeld, G. (1971). Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In Venomous Animals and their Venoms, Vol. 2. (Edited by W. B€uchel and E. Buckley), pp. 345–384. Academic Press, New York.
4. Gutiérrez, J. M. and B. Lomonte (2003) Efectos locales en El envenenamiento ofídico en América Latina. In Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Vol. 1. (Edited by J. L. C. Cardoso, F. O. França, H. W. Fan, C. M. S. Malaque and V. Haddad- Jr), pp.310–323. Sarvier, São Paulo.
5. Dutra, N. C., M. P. Telles, D. L. Dutra and N. J. Silva-Júnior (2008) Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* in Central Brazil using RAPD markers. *Genet. Mol. Res.* 7, 603–613.
6. Nogueira, C., R. J. Sawaya and M. Martins (2003) Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *J. Herp.* 37, 653–659.
7. Rucavado, A., T. Escalante, A. Franceschi, F. Chaves, G. Leon, Y. Cury, M. Ovadia and J. M. Gutiérrez (2000) Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa- EDTA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63, 313–319.
8. Doin-Silva, R., V. Baranauskas, L. Rodrigues-Simioni and M. A. Cruz-Hofling (2009) The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. *Photochem. Photobiol.* 85, 63–69.
9. Barbosa, A. M., A. B. Villaverde, L. G. Sousa, W. Ribeiro, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2008) Effect of low level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 51, 1236–1244.
10. Barbosa, A. M., A. B. Villaverde, L. Guimar~aes-Sousa, E. Munin, C. M. Fernandes, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2009) Effect of low-level therapy in the myonecrosis induced by *B. jararacussu* snake venom. *Photomed. Laser Surg.* 27, 591–597.

11. Goldberg, D. J. and B. A. Russell (2006) Combination blue (415 nm) and red (633 nm) LED phototherapy in the treatment of mild to severe acne vulgaris. *J. Cosmet. Laser Ther.* 8, 71–75.
12. Lee, S. Y., C. E. You and M. Y. Park (2007) Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. *Lasers Surg. Med.* 39, 180–188.
13. Sadick, N. A. (2009) Study to determine the effect of combination blue (415 nm) and near-infrared (830 nm) light-emitting diode (LED) therapy for moderate acne vulgaris. *J. Cosmet. Laser. Ther.* 11, 125–128.
14. Vinck, E. M., B. J. Cagnie, M. J. Cornelissen, H. A. Declercq and D. C. Cambier (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med. Sci.* 18, 95–99.
15. Baez, F. and L. R. Reilly (2007) The use of light-emitting diode therapy in the treatment of photoaged skin. *J Cosmet Dermatol.* 6, 189–194.
16. Whelan, H. T., M. T. T. Wong-Riley, J. T. Eells, J. N. VerHoeve, R. Das and M. Jett (2004) DARPA soldier self-care: rapid healing of laser eye injuries with light emitting diode technology. *RTO MP HFM* 109, 19–37.
17. Dall Agnol, M. A., R. A. Nicolau, C. J. D. Lima and E. Munin (2009) Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med. Sci.* 24(6), 909–916.
18. Caetano, K. S., M. A. Frade, D. G. Minatel, L. A. Santana and C. S. Enwemeka (2009) Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomed. Laser Surg.* 27(1), 111–118.
19. Lang-Bicudo, L., F. P. Eduardo, C. P. Eduardo and D. M. Zezell (2008) LED phototherapy to prevent mucositis: a case report. *Photomed. Laser Surg.* 26, 609–613.
20. Lim, W., S. Lee, I. Kim, M. Chung, M. Kim, H. Lim, J. Park, O. Kim and H. Choi (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg. Med.* 3, 614–621.
21. Hodgson, B. D., M. M. David, D. E. Salzman, D. Eastwood, S. Tarima, L. D. Williams, J. E. Sande, W. P. Vaughan and H. T. Whelan (2012) Amelioration of oral mucositis pain by NASA near-infrared light-emitting diodes in bone marrow transplant patients. *Support. Care Cancer* 20, 1405–1415.

22. de Morais, N. C., A. M. Barbosa, M. L. Vale, A. B. Villaverde, C. J. de Lima, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2012) Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed. Laser Surg.* 28, 227–2232.
23. Xavier, M., D. R. David, R. A. de Souza, A. N. Arrieiro, H. Miranda, E. T. Santana, J. A. Jr Silva, M. A. Salgado, F. Aimbare and R. Albertini (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg. Med.* 42, 553–558.
24. Camargo, M. Z., C. P. Siqueira, M. C. Preti, F. Y. Nakamura, F. M. de Lima, I. F. Dias, D. O. Toginho-Filho and S. P. Ramos (2012) Effects of light emitting diode (LED) therapy and cold water immersion therapy on exercise-induced muscle damage in rats. *Lasers Med. Sci.* 27, 1051–1058.
25. Karu, T., L. V. Pyatibrat and N. I. Afanasyeva (2004) A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem. Photobiol.* 80, 366–372.
26. Karu, T., L. V. Pyatibrat and G. Kalendo (1999) Thiol reactive agents eliminate stimulation of possible involvement of cellular redox status into low power laser effects. *Laser Ther.* 11, 177–187.
27. Lim, W., S. Lee, I. Kim, M. Chung, M. Kim, H. Lim, J. Park, O. Kim and H. Choi (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg. Med.* 39, 614–621.
28. Lim, W., J. Kim, S. Kim, S. Karna, J. Won, S. M. Jeon, S. Y. Kim, Y. Choi, H. Choi and O. Kim (2013) Modulation of lipopolysaccharide- induced NF- $\kappa$ B signaling pathway by 635 nm irradiation via heat shock protein 27 in human gingival fibroblast cells. *Photochem. Photobiol.* 89, 199–207.
29. Assis, L., A. I. Moretti, T. B. Abrahão, V. Cury, H. P. Souza, M. R. Hamblin and N. A. Parizotto (2012) Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg. Med.* 44, 726–735.
30. de Lima, F. M., A. B. Villaverde, R. Albertini, A. P. de Oliveira, H. C. Faria Neto and F. Aimbare (2010) Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. *Photomed. Laser Surg.* 28, 763–771.

31. Aimbire, F., F. V. Santos, R. Albertini, H. C. Castro-Faria-Neto, J. Mittmann and C. Pacheco-Soares (2008) Low-level laser therapy decreases levels of lung neutrophils anti-apoptotic factors by a NFkappaB dependent mechanism. *Int. Immunopharmacol.* 8, 603–605.
32. Mafra de Lima, F., M. S. Costa, R. Albertini, J. A. Jr Silva and F. Aimbire (2009) Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in *E. coli* lipopolysaccharide- induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg. Med.* 41, 68–74.
33. Nadur-Andrade, N., A. M. Barbosa, F. P. Carlos, C. J. Lima, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2011) Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med. Sci.* 27(1), 65–70.
34. Guimarães-Souza, L., C. S. Dale, N. Nadur-Andrade, A. M. Barbosa, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2011) Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Clin. Exp. Med. Lett.* 52(3–4), 97–102.
35. Zimmermann, M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.
36. FUNED Fundação Ezequiel Dias (2013). Available at: <http://funed.mg.gov.br/servicos-e-produtos/medicamentos-e-imunobiologicos/informacoes-sobre-aplicacao-de-soro-em-vitimas-de-animal-peconhentos>.
37. Takasaki, I., T. Andoh, H. Nojima, K. Shiraki and Y. Kuraishi (2001) Gabapentin antinociception in mice with acute herpetic pain induced by herpes simplex virus infection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 270–275.
38. Jenkins, P. A. and J. D. Carroll (2011) How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomed. Laser Surg.* 29, 785–787.
39. Huang, Y. Y., A. C. Chen, J. D. Carroll and M. R. Hamblin (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 7, 358–383.
40. Weiss, R. A., D. H. McDaniel, R. G. Geronemus, M. A. Weiss, K. L. Beasley, G. M. Munavalli and S. G. Bellew (2005) Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol. Surg.* 31, 1199–1205.
41. Barraviera, B. (1993) Estudo clínico dos acidentes ofídicos: revisão. *J.B.M.* 65, 209–250.

42. Chacur, M., G. Picolo, J. M. Gutiérrez, C. F. P. Teixeira and Y. Cury (2001) Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39, 1173–1181.
43. Teixeira, C. F. P., Y. Cury, S. Oga and S. Jancar (1994) Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicon* 32, 419–426.
44. Nadur-Andrade, N., A. M. Barbosa, F. P. Carlos, C. J. Lima, J. C. Cogo and S. R. Zamuner (2011) Lasers Med. Sci. 27, 65–70.
45. Enwemeka, C. S. (2001) Attenuation and penetration of visible 632.8 nm and invisible infra-red 904 nm light in soft tissue. *Laser Ther.* 13, 95–101.
46. Ferreira, D. M., R. A. Zangaro, A. B. Villaverde, Y. Cury, L. Frigo, G. Picolo, I. Longo and D. G. Barbosa (2005) Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. *Photomed. Laser Surg.* 23(2), 177–181.
47. Olivo, R. A., C. F. Teixeira, J. L. Wallace and S. R. Zamuner (2007) Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon* 49(5), 670–677.
48. Hati, R., P. Mitra, S. Sarker and K. K. Bhattacharyya (1999) Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* 29, 1–19.
49. Gutiérrez, J. M., R. D. G. Theakston and D. A. Warrell (2006) Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* 3, e150.
50. Gutiérrez, J. M., D. Williams, H. W. Fan and D. A. Warrell (2010) Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223–1235.
51. Morais, V., P. Berasain, S. Ifr\_an, S. Carreira, M. N. Tortorella, A. Negrón and H. Massaldi (2012) Humoral immune responses to venom and antivenom of patients bitten by *Bothrops* snakes. *Toxicon*

## Legends

**Figure 1.** Effect of LED treatment on mechanical allodynia of mice. Animals were injected intraplantar with BmV (1 lg) and after 30 min and 3 h were treated with 635 nm LED ( $\blacktriangle$ ; A) or 945 nm LED ( $\blacktriangle$ ; B). Allodynia was measured by the mechanical response to tactile stimulation assessed by a von Frey filament of 0.407 g (3.61 filament). Pain threshold was determined before (baseline values, time 0) and 1, 3, 6 and 24 h after BmV injection. Animals injected only with BmV ( $\blacksquare$ ) or injected with saline ( $\bullet$ ; control) were submitted to the same protocol. Each point represents the mean  $\pm$ SEM of five animals per group (# $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs BmV group).

**Figure 2.** Effect of LED treatment on mechanical hyperalgesia of mice. Animals were injected intraplantar with BmV (1 lg) and after 30 min and 3 h were treated with 635 nm LED ( $\blacktriangle$ ; A/B) or 945 nm LED ( $\blacktriangle$ ; C/D). Hyperalgesia was measured by the mechanical response to nociceptive stimulation assessed by von Frey filaments of 0.692 g (3.84 filament; A and C) and 1.202 g (4.08 filament; B and D). Pain threshold was determined before (baseline values, time 0) and 1, 3, 6 and 24 h after BmV injection. Animals injected only with BmV ( $\blacksquare$ ) or injected with saline ( $\bullet$ ; control) were submitted to the same protocol. Each point represents the mean  $\pm$ SEM of five animals per group (# $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs BmV group).

**Figure 3.** Effect of concomitant administration of antivenom and LED treatment on mechanical allodynia of mice. Animals were injected intraplantar with BmV (1 lg) and after 15 min received intravenous treatment with AV (0.2 IL). After 30 min and 3 h of BmV injection animals were treated with 635 nm LED ( $\blacktriangledown$ ; A) or 945 nm LED ( $\blacktriangledown$ ; B). Allodynia was measured by the mechanical response to tactile stimulation assessed by a von Frey filament of 0.407 g (3.61 filament). Pain threshold was determined before (baseline values, time 0) and 1, 3, 6 and 24 h after BmV injection. Groups of animals injected only with BmV ( $\blacksquare$ ), or injected with saline ( $\bullet$ ; control), or injected with BmV+AV ( $\blacktriangle$ ) were submitted to the same protocol. Each point represents the mean  $\pm$ SEM of five animals per group (# $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs BmV group).

**Figure 4.** Effect of concomitant administration of antivenom and LED treatment on mechanical hyperalgesia of mice. Animals were injected intraplantar with BmV (1 lg) and after 15 min received intravenous treatment with AV (0.2 IL). After 30 min and 3 h of BmV injection animals were treated with 635 nm LED ( $\blacktriangledown$ ; A/B) or 945 nm LED ( $\blacktriangledown$ ; C/D). Hyperalgesia was measured by the mechanical response to nociceptive stimulation assessed by Von Frey filaments of 0.692 g (3.84 filament; A and C) and 1.202 g (4.08 filament; B and D). Pain threshold was determined before (baseline values, time 0) and 1, 3, 6 and 24 h after BmV injection. Groups of animals injected only with BmV ( $\blacksquare$ ), or injected with saline ( $\bullet$ ; control), or injected with BmV + AV ( $\blacktriangle$ ) were submitted to the same protocol. Each point represents the mean  $\pm$ SEM of five animals per group (#P < 0.01 vs control group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 vs BmV group).

Figure 1

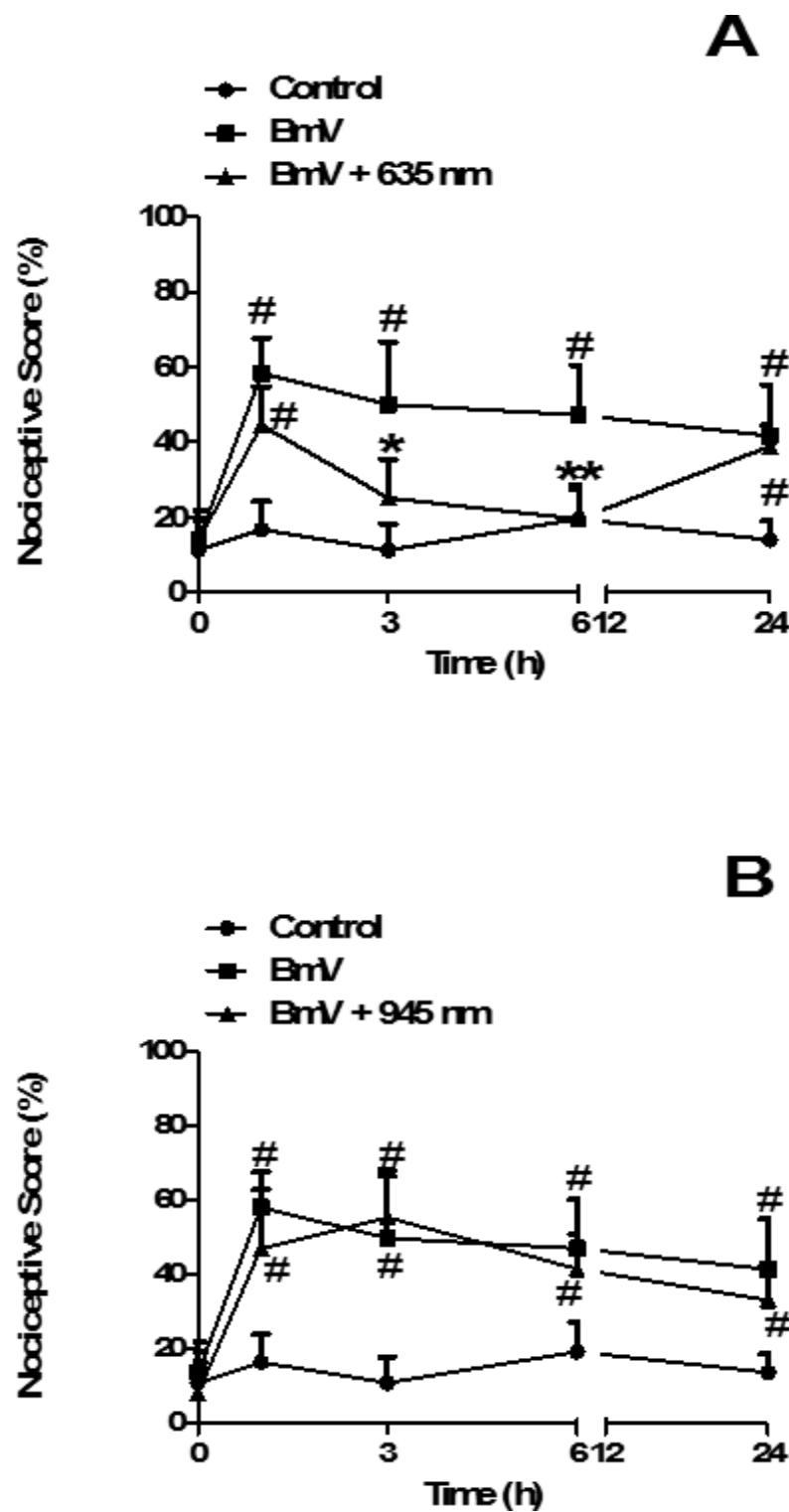


Figure 2

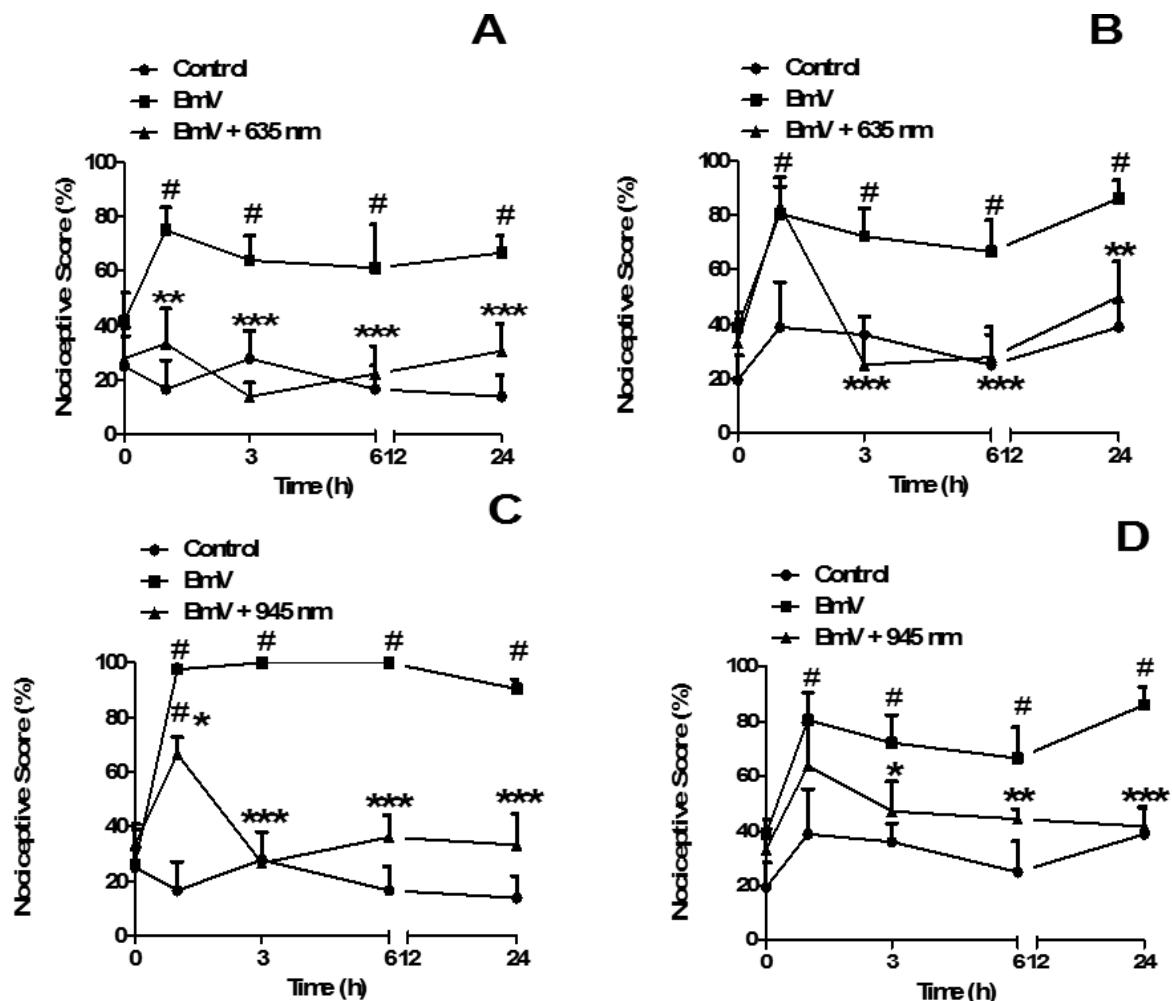


Figure 3

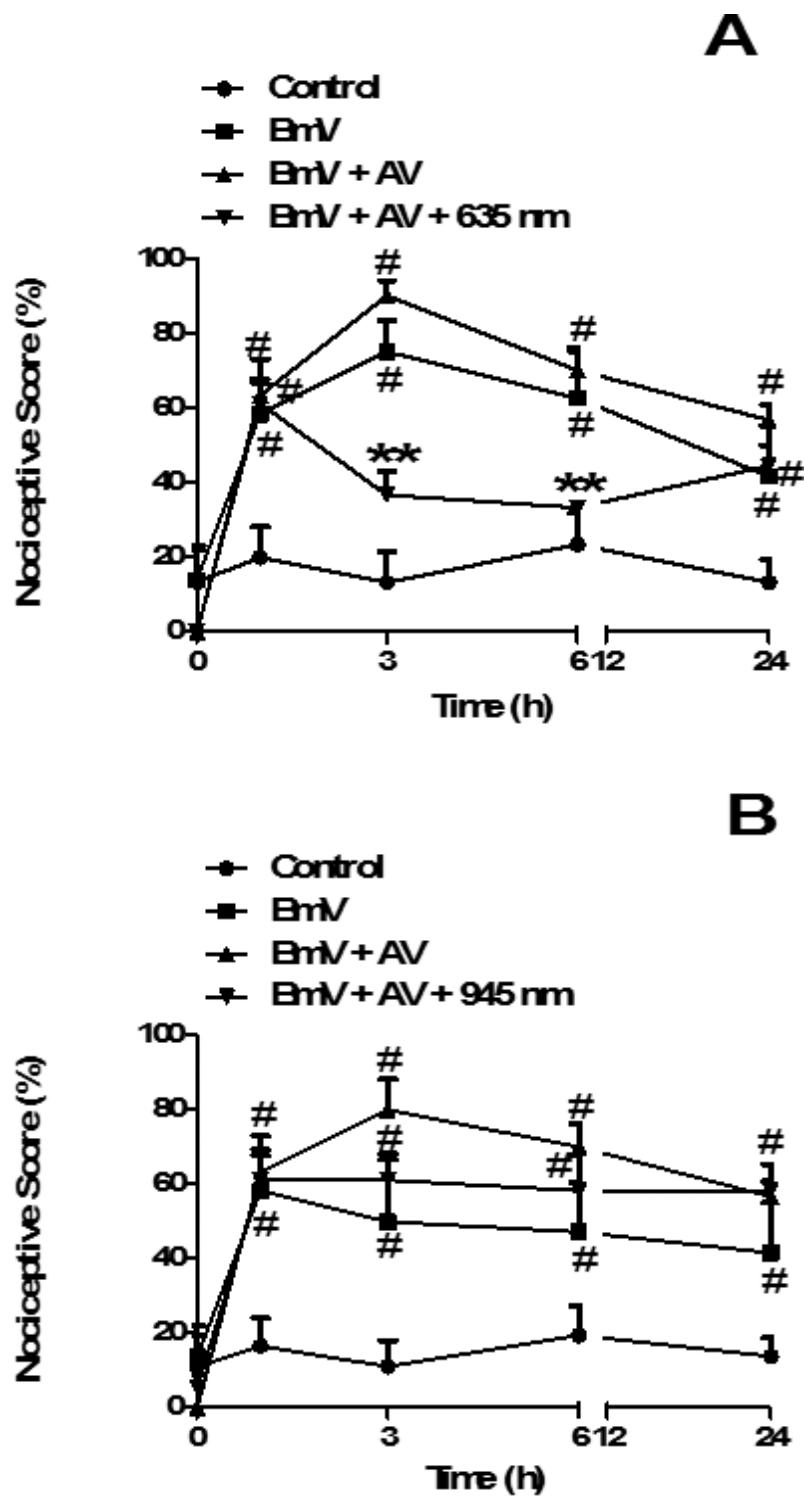
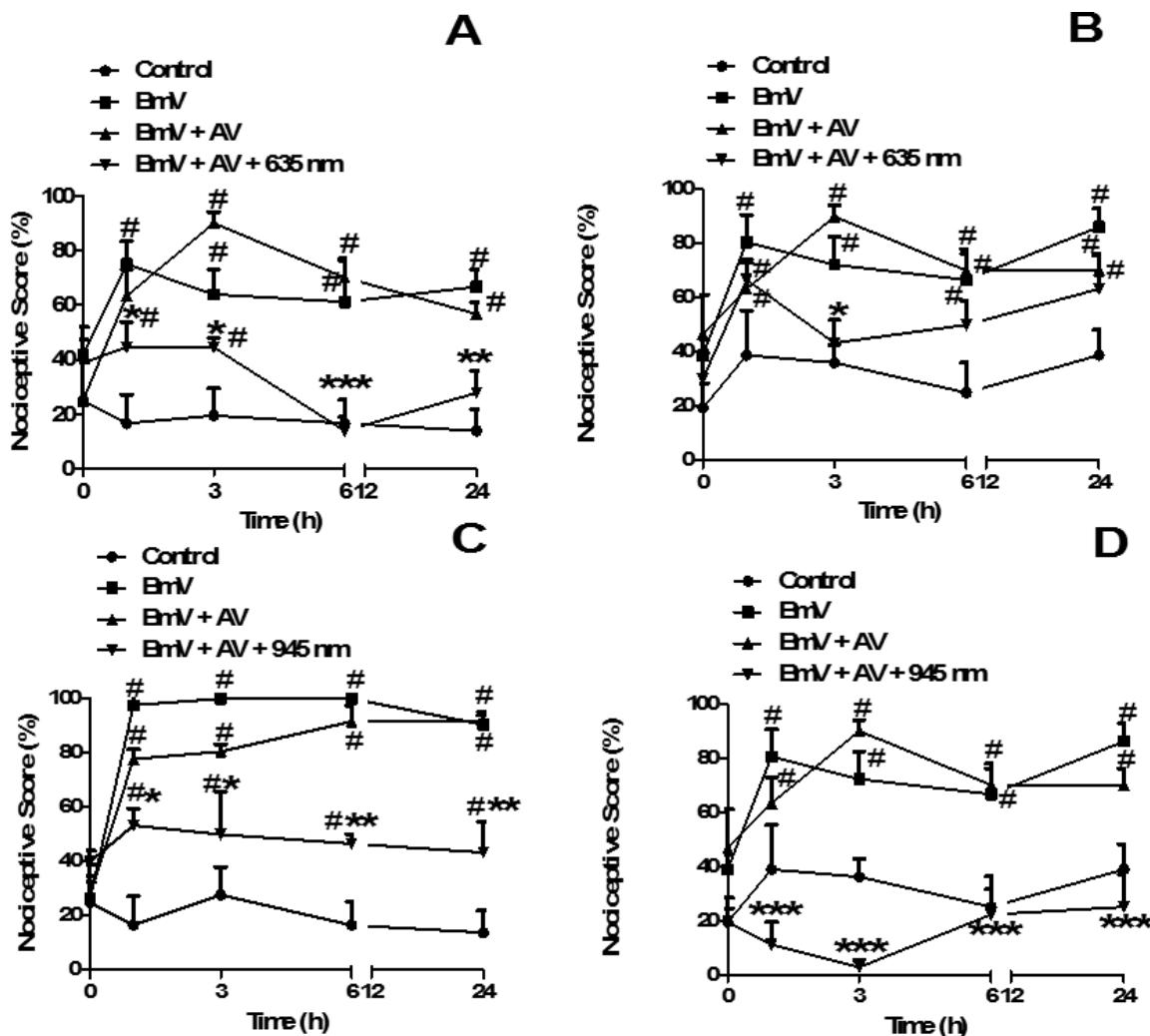


Figure 4



**3.2 Artigo Submetido na revista Photochemical & Photobiological Sciences****Photobiostimulation reduces edema formation induced by Lys-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops moojeni* venom.**

Nikele Nadur-Andrade<sup>1</sup>, Camila Squarzoni Dale<sup>2</sup>, Andreimar M. Soares<sup>3</sup>, Carlos J. de Lima<sup>4</sup>, Stella Regina Zamuner<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Oswaldo Cruz Foundation, Federal University of Rondonia, 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Biomedical Instrumentation, Camilo Castelo Branco University, São Jose dos Campos, Brazil.

Corresponding author:

Dr. Stella Regina Zamuner.

Address: Rua Vergueiro, 235, CEP 01504001, São Paulo-SP

Tel: 55 11- 3385-9222

Email: Stella.rz@uninove.br

## Abstract

The prominent myotoxic effects induced by *Bothrops* venom are due, in part, to the myotoxins. Two basic myotoxins named MjTX-I and MjTX-II, were isolated from *Bothrops moojeni* venom. Both myotoxins have a Lys-49 phospholipase A2 structure devoid of enzymatic activity, but are highly myonecrotic and edema-inducing. In this study, the effect of low-level laser (LLL) 685 nm, at a dose of 2.2 J/cm<sup>2</sup> and light emitting Diode (LED) 635 or 945 nm at a dose of 4 J/cm<sup>2</sup>, applied 30 min and 3 hs after edema formation caused by MjTX-I or MjTX-II, was analyzed. MjTX-I or MjTX-II caused a significant edema formation, in envenomed paw. LLL and LEDs irradiation significantly reduced the edema formation by both myotoxins from 1 up to 6 hours after the injection. Both LLL and LEDs were similar in reducing the edema formation induced by myotoxins. The combined photobiostimulation with antivenom had the same effect in reducing edema than treatment with the LLL or LEDs alone. In conclusion, the results of this study indicate that photobiostimulation could be used in association with antivenom therapy for treatment of local effects of *Bothrops* species venom.

## Introduction

More than 90% of the snakebites reported every year in Latin America are inflicted by snakes of the genus *Bothrops* (1; 2). The envenomation caused by *Bothrops* genus are characterized by important local tissue damage, with prominent edema that appears rapidly after the bite at the site where the venom was injected (3). Such edema, in turn, contributes to hypovolemia and may promote increments in intracompartmental pressures in some muscle compartments, thus inducing further ischemia and tissue damage (4; 5) Moreover, the local effects are very important in terms of medical and scientific interest since the antivenom administration does not efficiently neutralize the proteins, responsible for the local tissue damage process which may lead to permanent tissue loss, disability and, in some cases may require the amputation of the victim's affected limb (6; 7).

The most abundant myotoxic components in *Bothrops* snake venoms correspond to phospholipases A2 (PLA2) of classes II, which share structural features with the

PLA2s present in inflammatory exudates in mammals (8; 9). Class II PLA2s can be further subdivided into two main types commonly referred to as Asp49, which have an Asp residue at position 49, and Lys49 showing a Lys residue at position 49. Different from Asp49 PLA2s, Lys49 PLA2s have little or no enzymatic activity (10). In addition to their primary catalytic function, snake venom PLA<sub>2</sub>s show a variety of toxic/pharmacological effects which include neurotoxic, myonecrotic, cardiotoxic, hemolytic, hemorrhagic, hypotensive, anticoagulant, platelet aggregation inhibition and proinflammatory activities such as edema formation and leukocyte influx (11;12).

*Bothrops moojeni* is a South American snake that causes a number of envenomations in Southeastern Brazil. Two basic myotoxins of approximately 13.5 kDa, named MjTX-I and MjTX-II, were isolated from *Bothrops moojeni* venom (13; 14; 15). MjTX-I and -II do not show catalytic activity on artificial substrates as well as clotting or hemorrhagic activities, like others Lys 49 PLA2, but are highly myonecrotic and edema-inducing (16).

Treatment of snakebites is still carried out using traditional antivenom therapy (17). This treatment is effective in reversing the systemic effects caused by the venom. However, snake antivenom therapy is usually unable to prevent the progress of local effects (17). Thus, there is an important search to find therapies that can complement antivenoms in the neutralization of local tissue damage. Photobiostimulation with low level laser (LLL) and light emitting Diode (LED) have been proposed to complement the treatment of local effects caused by bothropic venom. This proposal is based on the literature that show a reduction of local effects induce by various *Bothrops* snake venom after photobioestimulation such as myonecrosis (18; 19); inflammation (20; 21; 22) hemorrhage (22) and pain (21; 23). Moreover, Barbosa *et al.*, (2010) (24) reported that LLL significantly reduced the edema, leukocyte influx and myonecrosis induced by BthTX-I and -II isolated from *B. jararacussu* snake venom.

The present study was therefore designed to evaluate the effects of LLL and LED treatment on the outcome of edema formation induced by PLA2 (MjTX-I and MjTX-II). Moreover, the effectiveness of available *Bothrops* AV used alone or in combination with LLL or LED treatment was also evaluated.

## **Materials and methods**

### **Animals**

All animal care was in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and experiments were approved by the Ethics Committee Animal Research of the Universidade Nove de Julho, SP, Brazil (UNINOVE; protocol number AN0021/2011). The experiments were performed using 45-day-old male Swiss mice (22–25 g) that were kept in plastic cages with water and food *ad libitum* and maintained under a controlled temperature on a 12-h light/dark cycle. Mice were divided into experimental groups of five animals each.

### **Myotoxin I (MjTX-I) and Myotoxin II (MjTX-II)**

*B. moojeni* myotoxins I and II were purified as previously described (15; 16), and were kindly provided by Oswaldo Cruz Foundation, Federal University of Rondonia, 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil

### **Evaluation of paw edema**

MjTX-I or MjTX-II solution was prepared by diluting 10 $\mu$ g of myotoxin in 50  $\mu$ L of a sterile saline solution that was injected intradermally into the subplantar region of the right hind paw. The left hind paw received an equal volume of sterile saline (50  $\mu$ L) and served as control. The volumes of both hind paws were measured by plethysmometry (plethysmometer model 7140; Ugo Basile, Comerio, Italy) before and 15, 30 min, 1, 2, 3 and 6 h after venom administration according to the method described by Van Arman *et al.* (1965) (25). Edema was expressed as the percentage increase in volume of the treated (right) paw relative to that of the control (left) paw at each time point.

### **Light sources, doses and treatment**

A low-level semiconductor GaAs laser (LLL; Theralaser D.M.C.; São Carlos, SP, Brazil) and two LED device, one on the red region and one on the infrared region (model Super Red LED-RL5-R3545; Super Bright LEDs, St. Louis, MO) were used for irradiation. The optical power of the laser was calibrated using a Newport multifunction optical meter (model 1835 C). The experimental parameters for the laser and LED are presented in Table 1 and Table 2 respectively. The LLL and LED doses, low enough to

avoid any thermal effect, were chosen on the basis of previous studies in our laboratory (20; 22) that had shown a beneficial effect of LLL and LED on the local effects induced by Bothropic venoms. The animals were immobilized manually and the LLL or LED irradiation was applied to the same area as the injection of MjTX-I or II or saline solution. The control group was treated using the same experimental procedure but with the laser or LED turned off. The animals were irradiated 30 min and 3 h after intraplantar myotoxin injection to evaluate the edema formation.

To investigate the effects of photobiostimulation combined with AV treatment, a volume of 50 µl of AV was injected intravenously 30 min after intraplantar injection of MjTX-I or -II. Animals were irradiated with LLL or LED, and edema was evaluated as described above. The volume of AV used was sufficient to neutralize the amount of *bothrops* venom injected since 1 mL of antivenom neutralizes 5 mg of *Bothrops* venom (according to manufacturer's specifications).

**Table 1 Protocol for LLL**

Parameters	LLL
Energy density (J/cm <sup>2</sup> )	2.2
Power (mW)	30
Irradiation time (s)	15
Irradiated area (cm <sup>2</sup> )	0.2
Wavelength (nm)	685
Energy per point (J)	0.45

**Table 2 Protocol for LED irradiation**

Parameters	Infrared LED	Red LED
Energy density (J/cm <sup>2</sup> )	4	4
Power (mW)	110	120
Irradiation time (s)	41	38
Irradiated area (cm <sup>2</sup> )	1.2	1.2
Wavelength (nm)	635	945
Energy per point (J)	4.51	4.56

## Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean. Statistical evaluation of data was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) and sequential differences among means were analyzed by Tukey test (Instat 3.01, GraphPad Software Inc, USA). Differences of results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### ***Edema formation induced by MjTX-I and II.***

Intraplantar injection of 10  $\mu$ g of MjTX-I or MjTX-II into the mouse hind-paw caused time-dependent increase in paw volume (edema). The maximum hind-paw swelling occurred 1 h after both myotoxins injection. However, MjTX-II caused an increase in paw volume at 1 h that was 44% higher than that caused by MjTX-I (Fig. 1).

### ***Effect of LLL on edema formation induced by MjTX-I and II.***

Treatment with LLL caused a reduction of 60 and 50 % on edema formation induced by MjTX-I at 1 and 3h, respectively (Fig. 2A). Likewise, LLL caused a reduction on edema formation which was 69.2, 45.5 and 25% lower than that caused by MjTX-II at 1, 3 and 6 h, respectively (Fig. 2B).

### ***Effect of red and infrared LED on edema formation induced by MjTX-I and II.***

As demonstrated in Figure 3, irradiation with red (Fig. 3A) or infrared LED (Fig. 3B) significantly reduced MjTX-I and MjTX-II-induced paw edema. Both LEDs irradiation significantly reduced paw edema from 1 up to 6 h, of the same magnitude.

### ***Effects of LLL combined with AV on edema formation induced by MjTX-I and II.***

Treatment with AV 30 min after MjTX-I or MjTX-II injection did not reduce edema formation (Fig. 4 and 5). The combination of AV treatment applied 30 min i.v.,

with LLL irradiation applied 30 min and 3 h after MjTX-I injection reversed the observed edema from the 1<sup>st</sup> up to 6 h of evaluation (Fig. 4A). Similar results were observed for MjTX-II (Fig. 4B).

#### ***Effects of LED combined with AV on edema formation induced by MjTX-I and II.***

Concomitant treatment of AV with red LED was effective in inhibiting edema formation of mice induced by MjTX-I similarly to that observed when animals were treated only with the LED (Fig. 5A). Also, for the infrared LED, once again, no changes on edema formation were observed when MjTX-II was injected (Fig. 5B). Both wavelength caused inhibition of edema formation of the same magnitude.

### **Discussion**

The rapid development of the local effects caused by botropic venom together with the incapacity of antivenoms to neutralize them, frequently result in the appearance of permanent physical and psychological sequelae in patients (5; 26). For these reason the search for new alternative treatments to the local effects induce by *Bothrops* snakebite, simultaneous with antivenom therapy, is increasing. In the current study we investigated the capacity of photobiostimulation using LLL and LED device to decrease the edematosigenic response induced by myotoxins MjTX-I and II isolated from *B. moojeni* venom. Both myotoxins are Lys49-PLA2, i.e. myotoxins with practically no hydrolytic activity on artificial substrates (27). However they induce myonecrosis and edema that are not neutralized by conventional antivenom (12).

In an attempt to investigate the efficacy of photobiostimulation on the outcome of edema formation induced by myotoxins, either LLL at 685 nm or LED on two wavelengths, at 635 or 945 nm were carried out. LLL and LEDs were applied 30 min after injection of myotoxins, at the same area. This time of laser or LED applications was chosen based in a previous work from our laboratory that shown a reduction of edema formation and hemorrhage after *Bothrops moojeni* venom injection (22). In the present work, LLL and both LED irradiation caused a significant edema reduction, when applied 30 min after MjTX-I or II injections. Similar results were found in the literature, which shows that LLL at a dose of 4,2 J/cm<sup>2</sup> were capable of inhibiting inflammatory process (edema and leukocyte influx) and myonecrotic process induced

by BthTX-I a Lys-49 and BthTX-II an Asp-49 myotoxins isolated by *B. jararacussu* venom (24). These authors also showed that LLL acts at the same intensity to reduce the inflammatory and myonecrosis processes for both BthTX-I and BthTX-II suggesting that enzymatic activity is not relevant for laser treatment. Furthermore, literature shows that laser or LED irradiation caused a reduction of muscle edema formation induced by crude venom of *B. jararacussu* (20) and paw edema induced by *B. jararacussu* and *B. moojeni* venom (21; 22). The mechanism by which photobiostimulation reduces venom-induce edema is not known. Experimental studies have demonstrated that venom PLA<sub>2</sub>-induced paw edema depends on the release of histamine and 5HT by mast cell degranulation with (28), also further vasoactive substances such as prostaglandins and kinins could mediate the local edema formation in response to snake venom PLA<sub>2</sub> (29;30). Moreover, Galvão Nascimento *et al.*, (2010) (31) have shown that the edema formation induced by *B. moojeni* venom is mediated by mast cell degranulation, prostaglandins and leukotrienes. In our experimental model, we suggest that the photobiostimulation acted through a reduction of of mast cell degranulation and in the release of prostaglandins, leukotrienes and kinins levels. Several studies have shown a reduction of prostaglandins by inhibition of COX-2 expression (32; 33) and kinins (34) after LLL irradiation, providing support to our hypothesis.

The capacity of antivenom to neutralize the venom-induced paw edema induced by myotoxins was also presently investigated. Our results demonstrated that treatment with AV 30 min after MjTX-I or MjTX-II myotoxins inoculation was not able to reduce the paw edema formation. These results agree with the literature that shows the inability of AV to neutralize local effecs caused by various Bothropic venom and isolated myotoxins (6; 20; 27).

In further studies, we evaluated the combined photobiostimulation with AV treatment; we found that photobiostimulation associated with AV treatment had the same effect on edema as LLL or LED irradiation alone. Similar results were showed by Nadur-Andrade *et al.*, (2011) (22) where photobiostimulation combine with AV was effective in reducing edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom in the same magnitude to photobiostimulation alone. Similar results were showed by Nadur-Andrade *et al.*, (2011) (22) where photobiostimulation combined with AV was effective in reducing edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom in the same magnitude to photobiostimulation alone. In contrast to our findings, a previous study with laser irradiation associated with AV treatment produced the greatest reduction in

muscle edema, after 24 hs of *B. jararacussu* venom injection, when compared with each treatment separately (20). This difference could be due to the rapid development of the paw edema in contrast to muscle edema.

In conclusion, this work indicates that photobioestimulation is able of inhibiting edema caused by PLA2 myotoxins. Moreover, the fact that LLL and LED can penetrate into the skeletal muscle could allow non-invasive treatment to be carried out with a low likelihood of treatment-related adverse events. Furthermore, photobioestimulation with the parameters used herein should be considered as a potential therapeutic approach for the treatment of local effects of *Bothrops* snakebite as well as an interesting tool for the study of the mechanisms underlying the inflammatory process activity induced by those myotoxins.

**Acknowledgments:** The authors are grateful for the financial support provided by a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) fellowship (grant no. 2012/09710-8) and by Universidade Nove de Julho (UNINOVE). SRZ is recipient of CNPq-PQ Grant.

## References

- 1- Fan HW & Cardoso JLC (1995). Clinical toxicology of snakebite in South America. In: Meier J & White J (Editors), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal, Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 667-688.
- 2- Gutiérrez J.M (1995). Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier J & White J (Editors), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal, Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 645-665.
- 3- Gutiérrez, J. M.; Fan, H.W.; Silvera, C. L. M. and Angulo, Y. (2009) "Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop," *Toxicon*, vol. 53, no. 6, pp. 625–630.
- 4- Mora, R.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. (2008) Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels: Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. PLoS neglected diseases. V. 2, 318.
- 5- Otero, R.; Gutiérrez, J. M.; Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, Gómez F, Toro A, Cano F, María Rodríguez L, Caro E, Martínez J, Cornejo W, Mariano Gómez L, Luis Uribe F, Cárdenas S, Núñez V, Díaz A (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40: 1107-1114.
- 6- Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. (1995) Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, v. 33, 1405-1424.
- 7- Salvador, G.H.; Cavalcante, W. L.; Dos Santos, J. I.; Gallacci, M.; Soares, A. M.; Fontes, M. R. (2013) Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A<sub>2</sub>-like. *Toxicon*. V.72, 52-63.
- 8- Kini, R. M. (1997) in *Venom Phospholipase A2 Enzymes. Structure, Function and Mechanism* (Kini, M. R., ed.) John Wiley & Sons, New York.
- 9- Villalobos, J.C.; Mora, R.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Ángulo, Y. (2007) Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicol In Vitro*. 21(8):1382-9.

- 10- Lomonte, B.; Angulo, Y.; Calderon, L. (2003a). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42, 885–901.
- 11- Zuliani, J. P.; Fernandes, C. M.; Zamuner, S. R.; Gutierrez, J. M., Teixeira, C. F. P. (2005) Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated form *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon*, v. 45, p. 335-346.
- 12- Stabeli, R. G., Amui, S.F, Sant'ana, C. D.; Pires, M.G.; Nomizo, A.; Monteiro, M. C.; Romao, P. R.; Guerra-sa, R.; Vieira, C. A.; Giglio, J. R.; Fontes, M. P.; Soares, A. M. (2006) Atividades Biológicas induzidas pela MjTX-II isolada do veneno de *Bothrops moojeni*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. v.142, n.3-4, p.371-381, 2006.
- 13- Soares, A. M.; Andrião-Escarso, S. H.; Ângulo, Y.; Lomonte, B.; Gutierrez, J. M.; Marangoni, S.; Toyama, M. H.; Arni, R. K.; Giglio J. R. (2000) Structural and Functional Characterization of Myotoxin I, a Lys49 Phospholipase A2 Homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) Snake Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* v. 373, p.7–15.
- 14- Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A°., 1994a. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 32, 1359–1369.
- 15- Soares, A. M.; Rodrigues, V. M.; Homsi-Brandeburgo, M. I.; Toyama, M. H.; Lombardi, F. R.; Arni, R.K.; Giglio, J. R. (1998)A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni*(Caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity.*Toxicon*, 36, pp. 503–514.
- 16- Soares, A. M.; Fontes, M. R. M.; Giglio, J. R. (2004). Phospholipases A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. *Curr. Org. Chem.* 8, 1677–1690.
- 17- Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B.; León, G.; Rucavado, A.; Chaves, F.; and Angulo, Y. (2007) “Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 13, no. 28, pp. 2935–2950.

- 18- Dourado, D. M.; Favero, S.; Baranauskas, V.; Cruz-Hofling, M. A. (2003) Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. *Lasers surg Med.* 33:352-357.
- 19- Barbosa, A. M.; Villaverde, A. B.; Sousa, L. G.; Munin, E.; Fernandez, C. M.; Cogo, J. C.; Zamuner, S. R. (2009) Effect of low level laser Therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Photomed and Laser Surgery*, 27(3): 1-7.
- 20- Barbosa, A. M.; Villaverde, A. B.; Guimarães-Souza, L.; Ribeiro, W.; Cogo, J. C.; Zamuner, S. R. (2008) Effect of low level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, (51): 1236–44.
- 21- Guimaraes-Souza, L.; Dale C. S.; Nadur-Andrade, N.; Barbosa, A. M.; Cogo, J. C.; Zamuner S.R. (2011) Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Clin Exp Med Lett*; 52(3-4): 97-102.
- 22- Nadur-Andrade, N.; Barbosa, A. B.; Carlos, F. P.; Lima, C. J.; Cogo, J. C.; Zamuner, S. R. (2011) Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med. Sci.* DOI 10.1007/s10103-011-0914-1.
- 23- Nadur-Andrade, N.; Zamuner, S. R.; Toniolo, E. F.; De Lima, C. J.; Cogo, J. C; Dale, C. S. (2014) Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on *Bothrops moojeni* Venom-Induced Hyperalgesia *Photochemistry and Photobiology*, 90: 207–213.
- 24- Barbosa, A. M. ; Villaverde, A. B. ; Guimarães-Souza, L. ; Soares, A. M. ; Zamuner, S. F. ; COGO, J. C. ; Zamuner, S. R. (2010) Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* (Online), v. 16, p. 470-479.
- 25- Van Arman, C. G.; Begany, A. J.; Miller, L. M.; Pless, H. H. (1965) Some details of inflammation caused by yeast and carrageenin. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, v. 150, p. 328-334.
- 26- Gutiérrez, J. M.; Williams, D.; Fan, H. W.; Warrell, D. A. (2010) Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7): 1223–35.
- 27- Salvador, G. H. M.; Fernandes, C. A. H.; Magro, A. J.; Marchi- Salvador, D. P.; Cavalcante, W. L.G.; Fernandez, R. M.; Gallacci, M.; Soares, A. M.; Oliveira, C. L.

- P.; Fontes, M. R. M. (2013) Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA2s Protein Class. *PLoS One*, 8, e60610.
- 28- Teixeira, C. F.; Landucci, E. C.; Antunes, E.; Chacur, M.; Cury, Y. (2003) Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 42(8):947-62.
- 29- Bonta, I. L.; Parnham, M. J. (1979) Time-dependent stimulatory and inhibitory effects of prostaglandin E1 on exudative and tissue components of granulomatous inflammation in rats. *Br J Pharmacol*. 65(3):465-72.
- 30- Ohsaka, A.; Motota, M.; Izumi, N.; Kondo, H. (1979) The use of differential thermal analysis and thermogravimetry to study the free and bound water of edema induced in rat skin by the toxin of Clostridium oedematiens. *Jpn J Med Sci Biol*. 32(2):124-5.
- 31- Galvão Nascimento, N.; Sampaio, M. C.; Amaral Olivo, R.; Teixeira, C. (2010) Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*. 55 (2-3):343-52.
- 32- Shimizu, N.; Yamaguchi, M.; Goseki, T.; Shibata, Y.; Takiguchi, H.; Iwasawa, T.; Abiko, Y. (1995) Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1 beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 74:1382–1388.
- 33- Assis, L.; Moretti, A. I. S.; Abrahão, T.B.; Cury, V.; Souza, H.P.; Hamblin, M. R.; Parizotto, N. A. (2012) Low level laser therapy (880 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rats tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med*. 44(9): 726–735.
- 34- Bortone. F.; Santos, H. A.; Albertini, R.; Pesquero, J.B.; Costa, M. S.; Silva Jr, J.A.(2008) Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *International Immunopharmacology*.8, 206–210.

## Legends

**Figure 1-** Time course of mouse paw edema induced by MjTX-I or II. Increase in paw volume was determined at selected periods of time after the i.pl. injection of MjTX-I or -II (10 µg/paw) into one paw and apyrogenic saline into the contralateral paw (control paw). The volume increase of paws (edema) was measured by plethysmometry. Data are expressed as % of change as compared to control paws. Each point is the mean ± SEM of 5 animals. \*p < 0.05 compared with MjTX-I.

**Figure 2-** Effects of LLL on paw edema formation induced by MjTX-I or -II. MjTX-I (A) and MjTX-II (B). Mice were injected with 10 µg/paw of either MjTX-I or -II in the right paw. Laser irradiation was performed 30 min and 3 h after myotoxins injection. The volume increase of the paws (edema) was measured by plethysmometry. Data are expressed as % of change as compared to control paws. Each point represents the mean ± SEM of 5 animals. \*p < 0.05 compared with MjTX-I or II without irradiation.

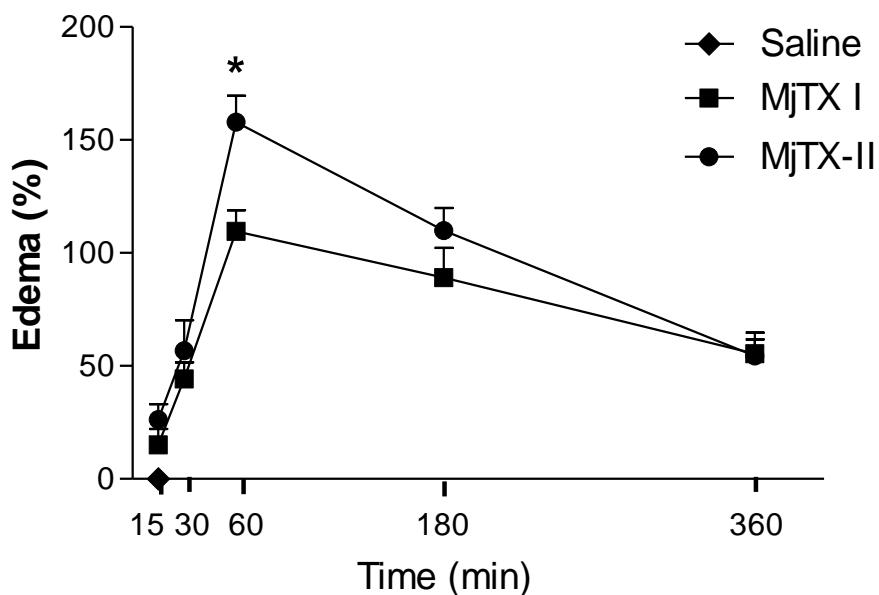
**Figure 3-** Effects of red and infrared LED on paw edema formation induced by MjTX-I (A) or MjTX-II (B). Mice were injected with 10 µg/paw of either MjTX-I or -II in the right paw. LED irradiation was performed 30 min and 3 h after myotoxins injection. The volume increase of the paws (edema) was measured by plethysmometry. Data are expressed as % of change as compared to control paws. Each point represents the mean ± SEM of 5 animals. \*p < 0.05 compared with MjTX-I or II without irradiation.

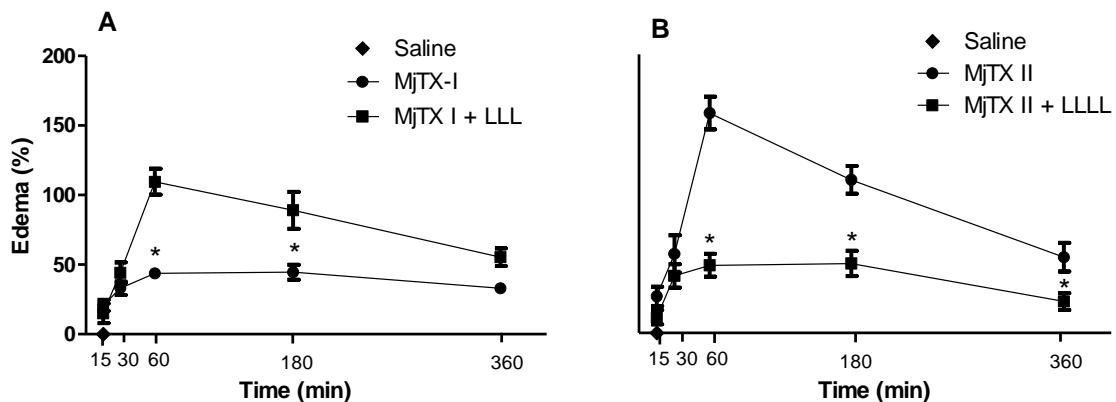
**Figure 4-** Effects of LLL and AV treatment on edema formation induced by MjTX-I (A) or MjTX-II (B). Mice were injected with 10 µg/paw of either MjTX-I -II in the right paw. The volume increase of the paws (edema) was measured by plethysmometry. LLL irradiation was applied 30 min and 3 h after myotoxins injection. AV was administered intravenously 30 min after myotoxins injection. Data are expressed as % of change as compared to control paws. Each point represents the mean ± SEM of 5 animals. \*p < 0.05 compared with MjTX-I or -II without irradiation.

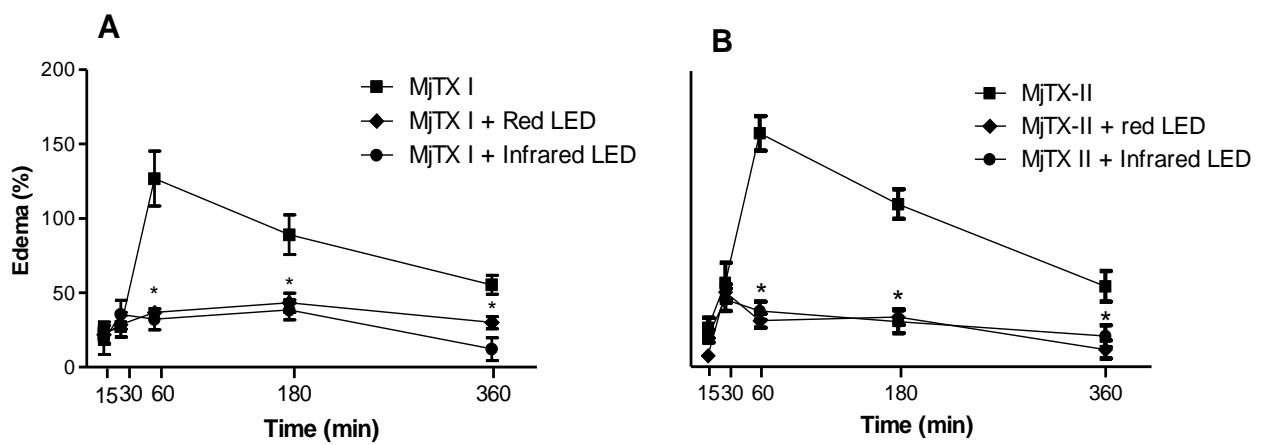
**Figure 5 -** Effects of red LED or infrared LED and AV treatment on edema formation induced by MjTX-I (A) or MjTX-II (B). Mice were injected with 10 µg/paw of either MjTX-I or -II in the right paw. The volume of increase of the paws (edema) was

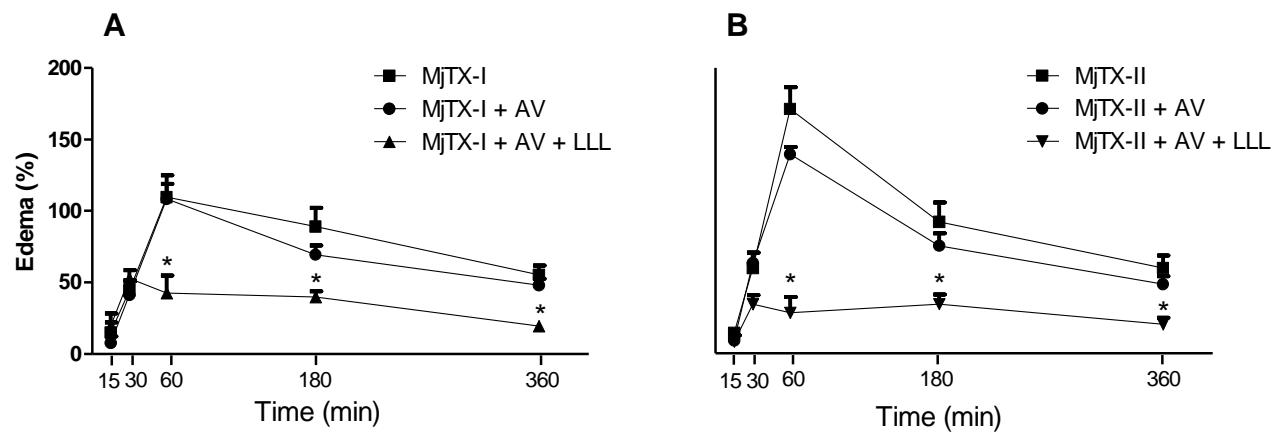
measured by plethysmometry. LED irradiation was applied 30 min and 3 h after myotoxins injection. AV was administered intravenously 30 min after myotoxins injection. Data are expressed as % of change as compared to control paws. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 5 animals. \* $p < 0.05$  compared with MjTX-I or -II without irradiation.

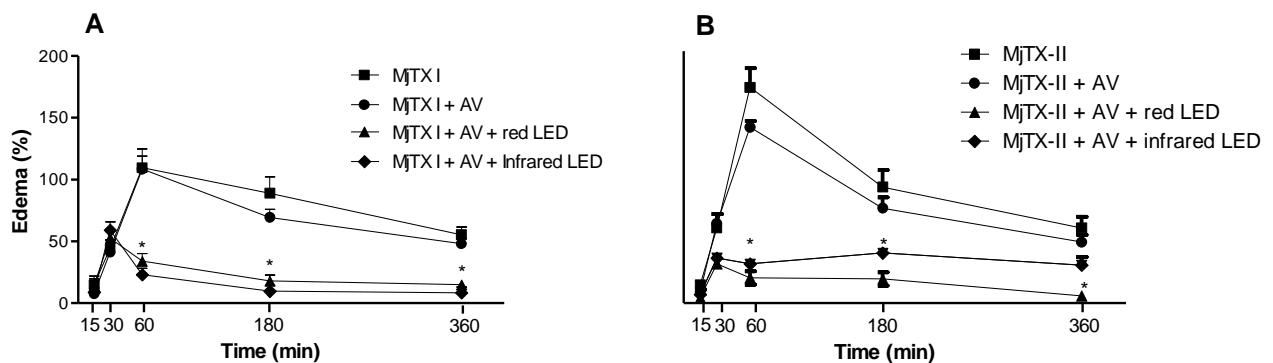
**Figure 1**



**Figure 2**

**Figure 3**

**Figure 4**

**Figure 5**

27-Mar-2014 **Photochemical & Photobiological Sciences**

Dear Miss Zamuner:

Your manuscript entitled "Photobiostimulation reduces edema formation induced by Lys-49 phospholipases A2 isolated from Bothrops moojeni venom." has been successfully submitted online to Photochemical & Photobiological Sciences.

Your manuscript ID is PP-ART-03-2014-000111.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence relating to this manuscript. If there are any changes to your contact details, please log in to the RSC Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ppsci> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by logging into your Author Center at <http://mc.manuscriptcentral.com/ppsci>.

Thank you for submitting your manuscript to Photochemical & Photobiological Sciences.

Yours sincerely,  
Photochemical & Photobiological Sciences Assigning Editorial Office

### 3.3 Dados ainda não publicados

#### Materiais e Métodos

**Animais:** Foram utilizados camundongos swiss, machos, com 4 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério local ou por instituição consorciada e mantidos em local apropriado, com temperatura controlada ( $22\pm2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro e escuro (12/12 horas), com acesso livre à água e ração por um período mínimo de três dias antes de serem utilizados nos experimentos. Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando-se os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nociceção (ZIMMERMANN, 1983) e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho (AN0021/2011).

**Veneno:** Veneno total liofilizado de *Bothrops moojeni* foi mantido a  $10^{\circ}\text{C}$  e preparado (p/v) em solução estéril de NaCl 0,9%, no momento do uso. A dose usada foi de  $1\mu\text{g}$  por animal, injetado por via i.pl., em uma das patas posteriores do animal.

**Laser :** O tratamento foi realizado com a utilização do laser de baixa potência (LBP), (modelo Photon Lase III DMC., São Carlos, S.P. Brazil). A irradiação laser foi realizada, trinta minutos e três horas após a administração do veneno (NADUR-ANDRADE *et al.*, 2011). Os animais foram imobilizados manualmente e o LBP foi aplicado em contato com a área onde foi dada a injeção de veneno ou solução salina.

#### – Protocolo de irradiação laser

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda	660 nm
Potência	30 mW
Tempo	15 "
Energia por ponto	0,45 J
Área Irradiada	0,2 cm <sup>2</sup>

**Hiperalgesia mecânica e alodínia táctil:** A hiperalgesia mecânica e a alodínia táctil na pata foram avaliadas conforme descrito por Takasaki *et al.* (2000). Os camundongos foram colocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente, sobre uma plataforma com fundo de grade. Após um período de aclimatização de 20 minutos, os filamentos de Von Frey com as forças de 0,407 g (filamento de 3,61), 0,692 g (filamento de 3,84) e 1,202 g (filamento de 4,08), foram aplicados perpendicularmente, sob a pele do músculo plantar por 3 a 5 segundos. A estimulação com mesma intensidade foi aplicada três vezes sob a mesma pata, com intervalo de alguns segundos. As respostas a estes estímulos foram avaliadas antes e em diferentes tempos após os tratamentos e classificadas como segue: 0, nenhuma resposta; 1, movimento de retirada para longe do estímulo; e 2, retirar e lamber após o estímulo. O score nociceptivo será calculado como segue:

$$\text{Score nociceptivo (\%)} = \frac{\Sigma (\text{média do score de cada animal})}{2 \times (\text{nº de animal})} \times 100$$

Os resultados foram analisados pela comparação das médias das medidas iniciais e ou finais, ou comparando-se as medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais.

**Hiperalgesia Térmica:** A hiperalgesia térmica da pata posterior foi medida de acordo com o método descrito por Hargreaves *et al.* (1988). Este teste utiliza como estímulo nocivo o calor induzido por energia radiante. A hiperalgesia térmica foi definida como a latência, em segundos, da permanência da pata dos animais sobre um foco de luz radiante, com temperatura constante de  $50\pm1^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram avaliados antes e em diferentes tempos após a indução da hiperalgesia inflamatória. Os resultados foram analisados pela comparação das médias das medidas iniciais e ou finais, ou comparando-se as medidas obtidas nos diferentes grupos experimentais.

**Avaliação da neutralização pelo soro antibotrópico polivalente:** O soro antibotrópico foi aplicado pôr via endovenosa (e.v), trinta minutos após a injeção do veneno de *Bothrops moojeni*, tendo por base a especificação do fabricante, em que 1 mL de soro antibotrópico poliespecífico neutraliza 5 mg de veneno botrópico (FUNED). Foi então, avaliada a hiperalgesia mecânica e térmica.

**Avaliação da neutralização pelo soro antibotrópico polivalente mais o tratamento com Laser baixa potência:** Foi injetado nos animais o antiveneno

botrópico trinta minutos após a injeção do veneno e tratado com o laser de baixa potência. Foi avaliado a hiperalgesia mecânica e térmica, conforme descrito acima.

**Imunohistoquímica:** A imunohistoquímica foi efetuada segundo o método descrito por Castex *et al.* (1995). Camundongos injetados com veneno de *B. moojeni* ou salina, tratados ou não com LBP ou soro antibotrópico foram anestesiados i.p. profundamente com uma associação de quetamina e xilazina (1:1, 100µL/100g de peso corpóreo) após 6 hs dos tratamentos, sendo, então, realizada perfusão sistêmica através de uma cânula introduzida no ventrículo esquerdo com 50 ml de salina tamponada (PBS 0.1 M) e, em seguida com 150 ml de fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0.1 M). Imediatamente após, foi realizada a retirada das medulas espinais, na altura das lâminas 4 e 5, as quais permaneceram no mesmo fixador por no mínimo 5 horas sendo, em seguida, “crioprotegidas” por 24 horas em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato. As amostras de medulas foram cortadas por congelação (20 µm) e os cortes coletados em tampão fosfato. Depois de obtidos, os cortes foram submetidos à metodologia imunohistoquímica para detecção da ativação neuronal. Os cortes histológicos foram mantidos sob agitação constante e submetidos às seguintes etapas: a) duas lavagens de 10 min cada, em PB contendo 0,3% de triton X-100; b) incubação por 12-16 h com os anticorpos primários específicos para marcação neuronal (c-Fos) diluído a 1:1000; c) três lavagens de 10 min cada com PB; d) incubação durante 2 h à temperatura ambiente, com antícorpo secundário biotinilado (Jackson ImmunoResearch, Pensilvania/EUA) diluídos a 1:200 em PB; e) três lavagens em PB; g) incubação com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA/EUA) durante 1 hora; f) marcação com peroxidase usando o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB-Sigma-Aldrich, EUA) e uma solução de peróxido de hidrogênio 0,01% em PB. Os cortes histológicos da medula foram montados sobre lâminas de vidro gelatinizadas. As lâminas contendo os diferentes tipos de cortes histológicos foram submetidas à desidratação à temperatura ambiente, proteção com meio de montagem à base de glicerol e cobertura. A imunorreatividade foi analisada ao microscópio de luz e quantificações foram realizadas com o programa Image J.

**RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR):** Para a quantificação da expressão do RNAm de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , B1 e B2, foram utilizados os RNAs totais extraídos de amostras congeladas para a realização da qPCR (PCR quantitativo em Tempo Real).

Os tecidos congelados (~100 mg) foram inicialmente homogeneizados em 1 ml de TRIzol Reagent (*Gibco BRL, Gaithersburg, EUA*) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen GENERATOR, Fisher Scientific, Alemanha). O isolamento do RNA total foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. Os RNAs foram quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop) com leitura em filtro de 260 nm. Um micrograma de RNA foi utilizado para síntese de cDNA e para análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Inicialmente, o DNA contaminante foi removido através DNase I (Invitrogen), na concentração de 1uni/ $\mu$ g RNA na presença de 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, contendo 2 mM MgCl<sub>2</sub> por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 95°C durante 5 minutos para inativação da enzima. Logo após a quantificação, foram realizadas as reações de transcrição reversa (RT), para a síntese do cDNA. Ao RNA foram adicionados 5  $\mu$ l de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (Invitrogen), 1 $\mu$ l de Oligo-dt (Invitrogen) 1,25  $\mu$ l de oligonucleotídeos (DNTPs, 10 mM) para uma reação de 25  $\mu$ l. A reação foi realizada em equipamento PCR Vertiti® (Applied Biosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 10 min a 20 °C, 40 min a 42 °C e 5 min a 85 °C.

As reações de amplificação para os genes IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , B1 e B2 foram obtidas por PCR quantitativa em tempo Real, pelo sistema ABI 7500 Fast RT-PCR no modo standard, utilizando-se “SYBR Green” (Applied Biosystems) nas seguintes condições: a 1,0  $\mu$ l de cDNA, foram adicionados 0,5  $\mu$ l de óligo iniciador sense (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de óligo iniciador anti-sense (10 $\mu$ M), 7,5  $\mu$ l de Master Mix 2X (Applied Biosystems) e água suficiente para 15  $\mu$ l de reação. As condições dos ciclos térmicos foram: 95 ° C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 .min. As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto de dados. O mRNA dos genes alvo foram quantificados como um valor relativo em comparação com uma referência interna, GAPDH, cuja abundância se acredita não mudar entre as condições experimentais diferentes.

Os oligonucleotídeos utilizados foram: Interleucina-6 - 5'-GAGGAGACTCACAGAGGAT-3' e reverso 5'- TCCTTAGCCACTCCTCTGT-3' (Número de acesso no GenBank NM\_012589.2); Interleucina-1 $\beta$  - 5'-CAGGAAGGCAGTGTCACTCA-3' e reverso 5'- GGGATTTCGTTGCTTGT-3' (Número de acesso no GenBank M98820.1). GAPDH - 5'-TGCACCACTGCTTAGC-3' e reverso 5- GCCCCACGGCCATCA-3'(número

de acesso GenBank NM\_017008), TNF- $\alpha$  5'-AAATGGGCTCCCTATCAGTTC-3' e reverso 5'-TCTGCTTGGTGGTTGCTACGAC-3' (número de acesso GenBank X66539), Receptor B1 de cininas 5'- CAACAGCTGCTGAACCCAC-3' e reverse 5'- ACATGGGCATGAGGCTTCTC-3' (número de acesso GenBank NM\_030851.1) Receptor B2 de cininas - 5'- ACTGTCCAAGGCCATACCGT-3' e reverse 5'- CCCAGAAGGGTAATCCGCAG-3' (número de acesso GenBank NM\_001270713.1). O “software 7500 v2.06 (Applied Biosystems) será utilizado para processamento dos dados.

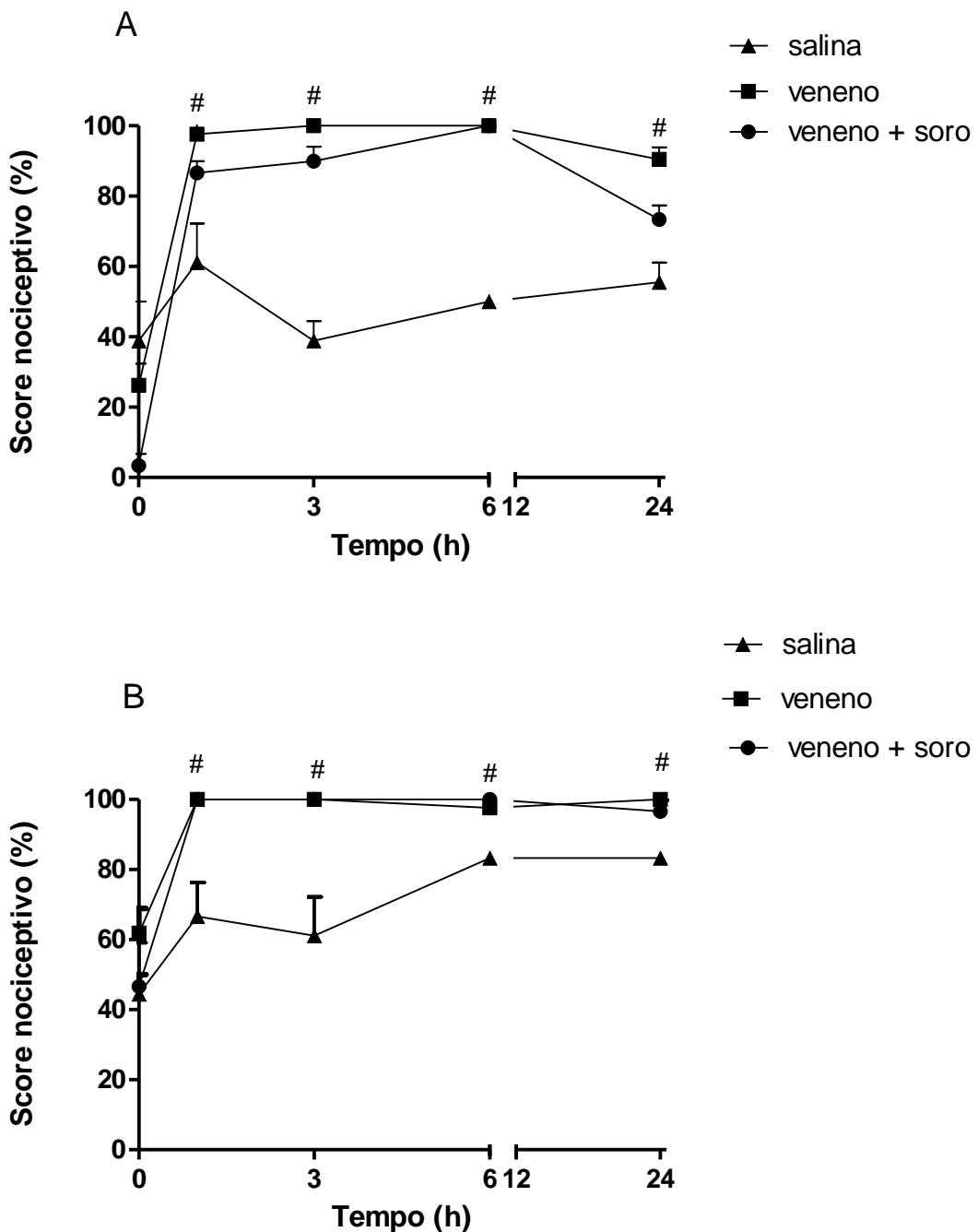
**Método estatístico:** Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para detectar as diferenças das médias após a Análise de Variância (Snedecor, 1956; Snedecor & Cochran, 1974). O índice de significância considerado foi de  $p<0,05$ . Calculado com software GraphPad Instat tm/GraphPad Software V2.01-Copyright ©, 1990-1993.

## **Resultados não publicados**

### **3.3.1 Efeito do soro antibotrópico na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.**

Os animais foram injetados, por via i.pl. com o veneno de *B. moojeni*, na dose de 1 $\mu$ g ou salina (animais controle), no mesmo volume (50  $\mu$ l). Animais foram tratados com soro antibotrópico (0,2 mL/animal) 30 minutos após a injeção do veneno. O veneno de *B. moojeni* acarretou um aumento da sensibilidade à dor mecânica, quando comparada à medida inicial (Fig. 1 A). O efeito hiperalgésico máximo foi observado na 1<sup>a</sup> hora após a injeção do veneno, se mantendo elevada até a 24<sup>a</sup> hora. Animais controle, injetados com salina não apresentaram alterações significativas de sensibilidade à dor, durante o período de experimentação.

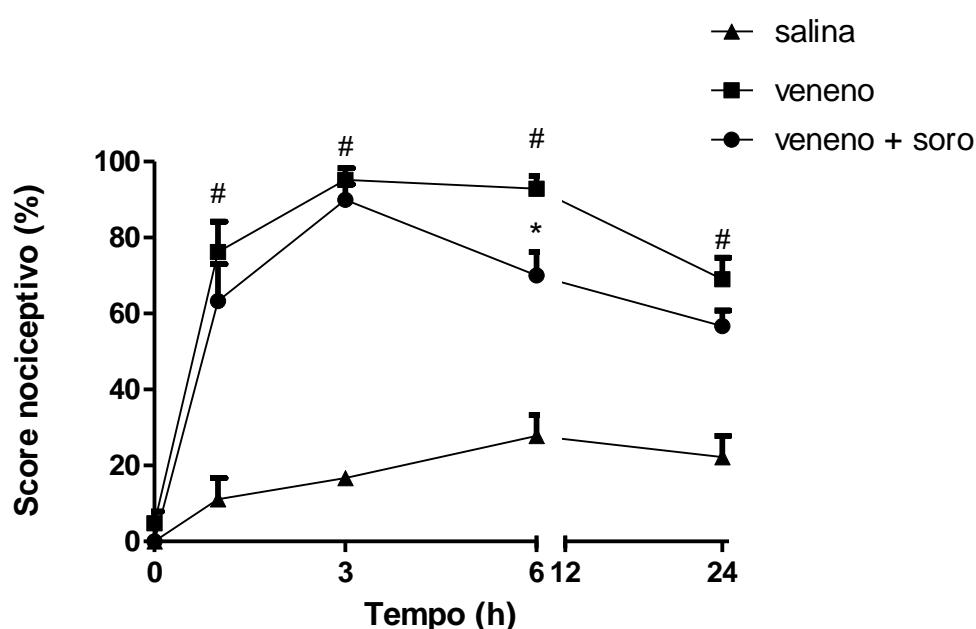
Os resultados demonstraram que os animais tratados com o antiveneno não apresentaram redução significativa da sensibilidade à dor mecânica quando comparados com animais injetados com veneno nos tempos estudados (Fig. 1 B).



**Figura 1. Efeito do soro antibotrópico sobre o efeito nociceptivo induzido pelo veneno de *B. moojeni*.** Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* (1 $\mu$ g/pata) ou salina (grupo controle). O antisoro foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. Escores nociceptivos foram avaliados com filamentos Von Frey para (A) 3,84 e (B) 4,08. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. #p<0,05 em relação ao grupo Salina (ANOVA).

### 3.3.2 Efeito do soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

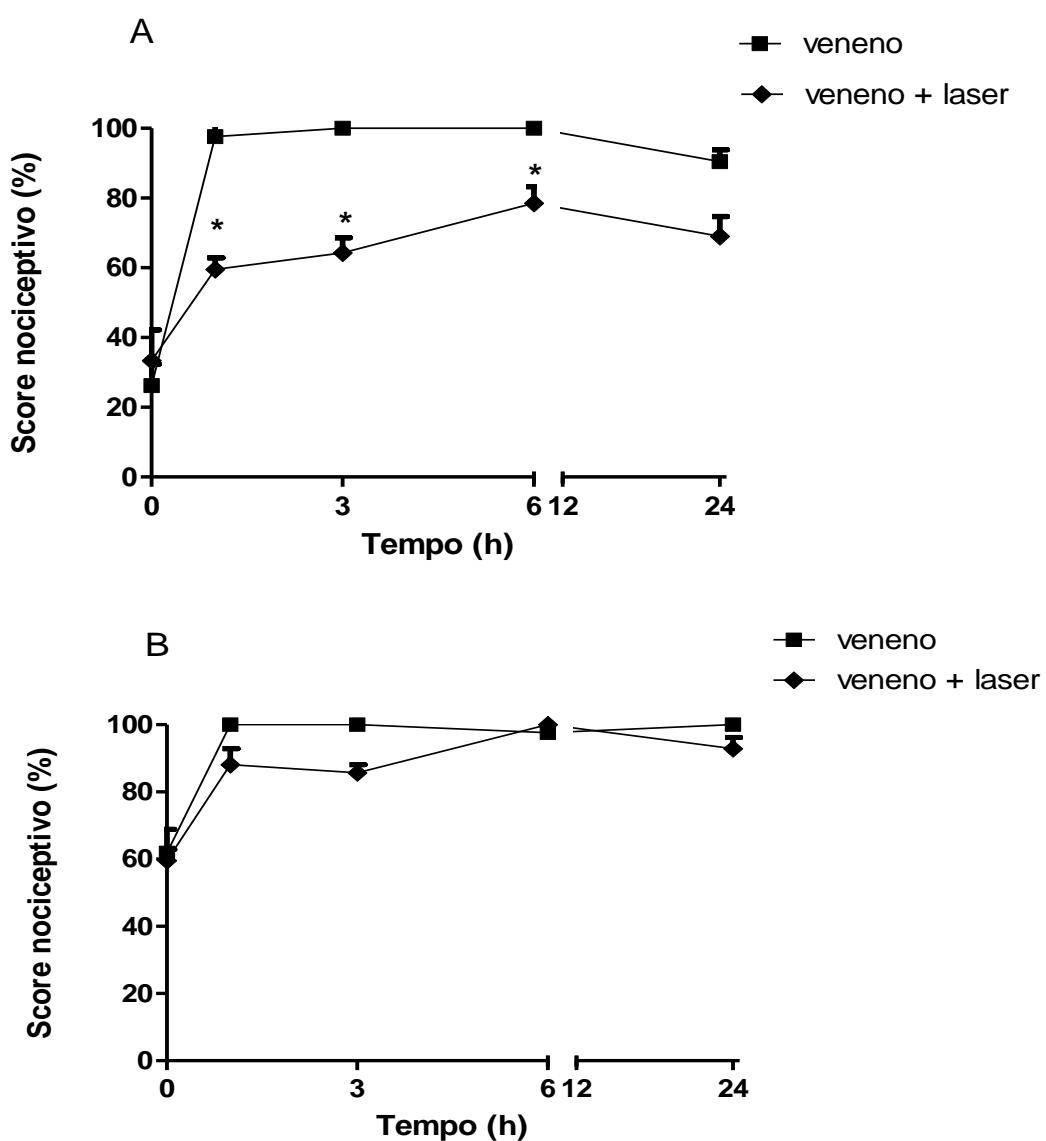
Animais injetados com veneno de *B. moojeni* via i.pl., na dose de 1 µg, foram avaliados pelo teste de estimulação tátil, para se determinar a presença de alodínia. Os resultados demonstram que o soro antibotrópico reduziu a alodínia somente na 6<sup>a</sup> hora após a injeção do veneno de *B. moojeni*, sendo ineficaz nos demais tempos analisados (Fig. 2).



**Figura 2.** Efeito da neutralização pelo soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de *B. moojeni*. A alodínia foi medida pelo limiar da resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de Von Frey para filamento 3,61 (estímulo alodíneo). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno de *B. moojeni* (1µg) ou salina (grupo controle). O antisoro foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais. #p< 0,05 em relação ao grupo salina, \* p<0,05 em relação ao veneno (ANOVA).

### 3.3.3 Efeito do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta hiperalgésica mecânica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

O potencial do efeito antinociceptivo do LBP aplicados em dois tempos (meia e terceira hora) após a injeção do veneno, demonstrou redução significativa da hiperalgesia mecânica (filamento de 3,84) nos tempos de 1, 3 e 6 horas (Fig. 3A), entretanto o filamento 4,08 não apresentou redução significativa da sensibilidade dolorosa com o uso do tratamento com o LBP (Fig. 3 B).

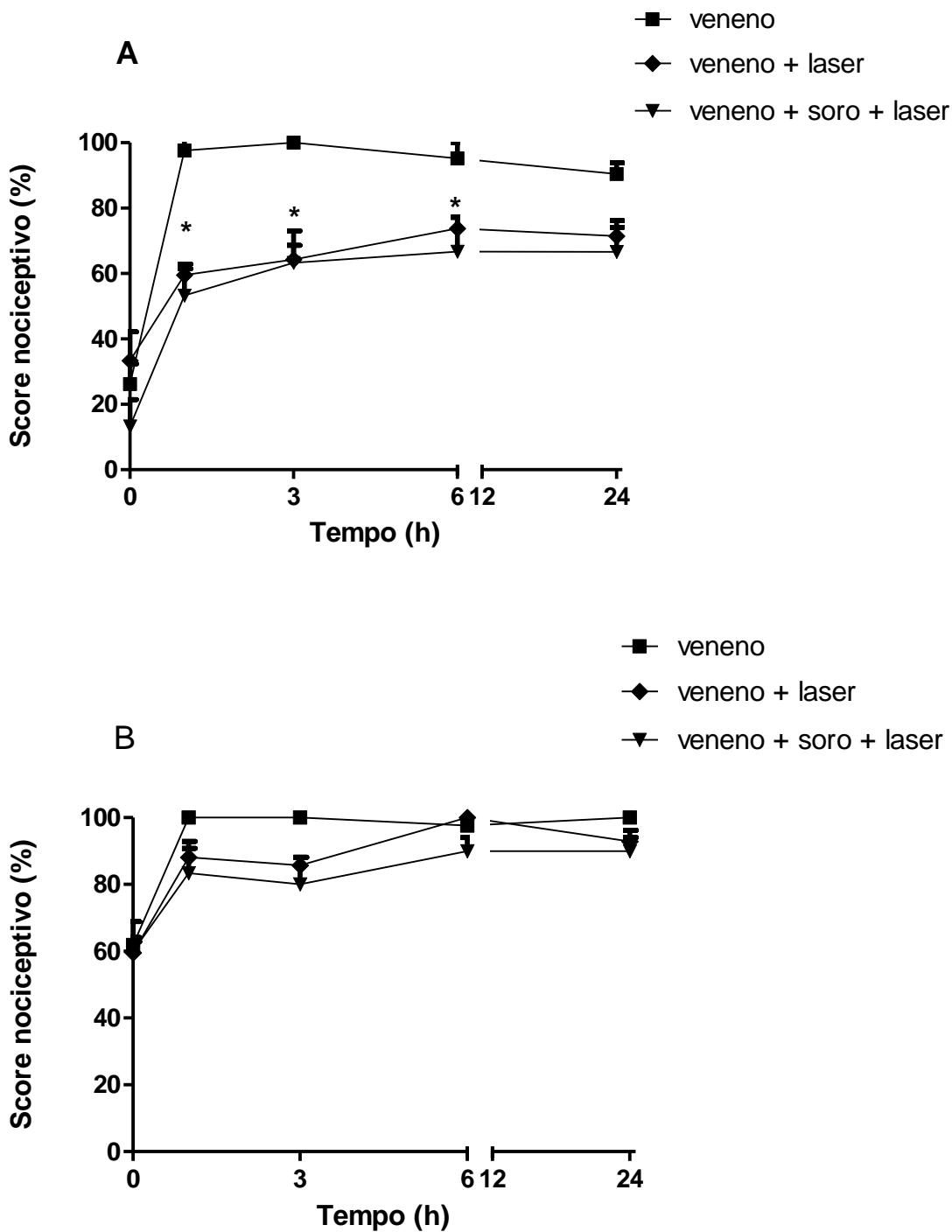


**Figura 3.** Efeito do LBP sobre o efeito nociceptivo induzido pelo veneno de *B. moojeni*. Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* (1 $\mu$ g/pata) ou salina (grupo controle). A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0 e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. Escores nociceptivos foram avaliados com filamentos von Frey para (A) 3,84 e (B) 4,08. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*p < 0,05 em relação ao veneno (ANOVA).

### **3.3.4 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia mecânica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.**

Para avaliar a eficácia da combinação dos tratamentos, os animais foram tratados com o LBP conjuntamente com o antiveneno. A figura 9 demonstra o tratamento do LBP conjuntamente com o soro antibotrópico após a injeção do veneno de *B. moojeni*. O tratamento conjunto apresentou o mesmo efeito na redução da sensibilidade dolorosa, quando aplicado o filamento 3,84 e comparado com o laser sozinho (Fig. 4 A).

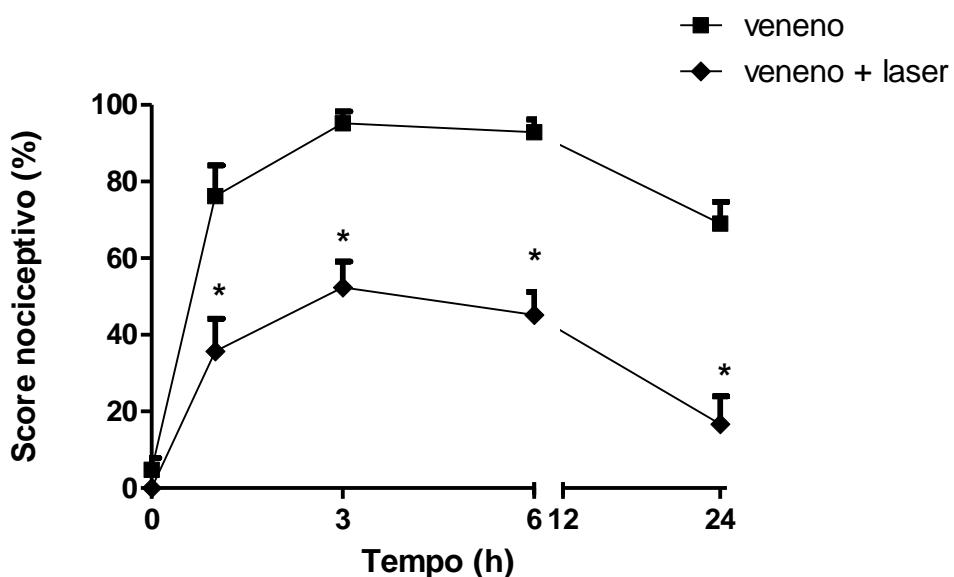
A combinação de tratamentos não alterou a intensidade ou evolução da resposta hiperalgésica mecânica quando utilizado o filamento 4,08 e comparado com o veneno sozinho (Fig. 4 B).



**Figura 4.** Efeito do Laser conjuntamente com o soro antibotrópico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* ( $1\mu\text{g/pata}$ ) ou salina (grupo controle). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. O soro foi administrado (i.v.) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Escores nociceptivos foram avaliados com filamentos Von Frey para (A) 3,84 e (B) 4,08. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao veneno (ANOVA).

### 3.3.5 Efeitos do laser de baixa potência na alodínia após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

Para avaliar a capacidade do laser de baixa potência em alterar o limiar tátil, animais injetados com veneno de *B. moojeni* via i.pl., na dose de 1 µg, foram avaliados pelo teste de estimulação tátil, para se determinar a presença de alodínia. Os resultados demonstram que o laser de baixa potência causou uma redução significativa da alodínia a partir da primeira até a 24<sup>a</sup> hora, quando comparados com animais injetados com o veneno sozinho (Fig. 5).

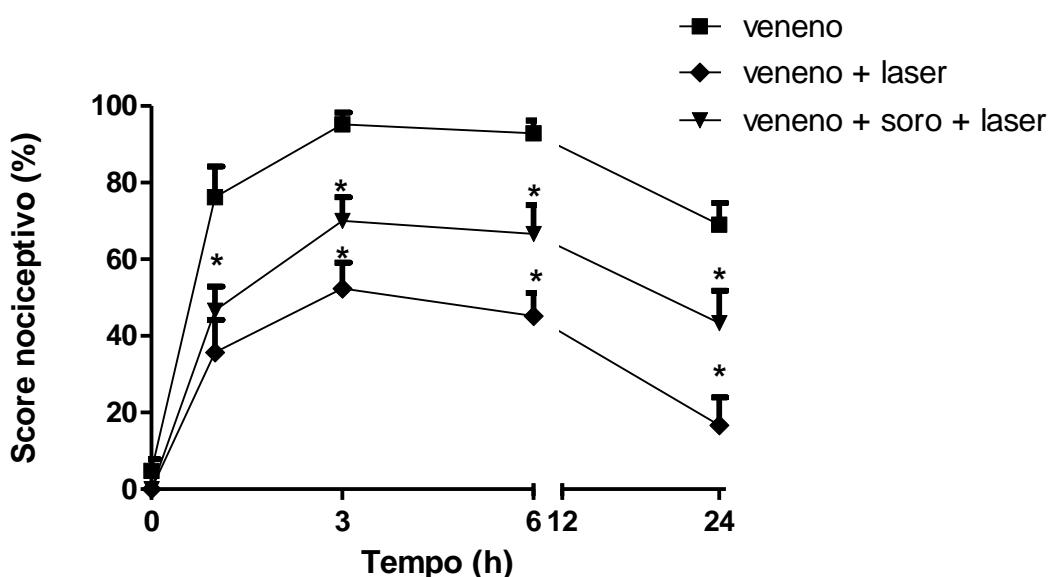


**Figura 5. Efeito do Laser de baixa potência sobre a alodínia induzida pelo veneno de *B. moojeni*.**  
A alodínia foi medida pelo limiar da resposta ao estímulo tátil avaliado por meio da utilização de filamentos de Von Frey para filamento 3,61 (estímulo alodíneo). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno de *B. moojeni* (1 µg) ou salina (grupo controle). A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais. \*p< 0,05 em relação ao veneno (ANOVA).

### 3.3.6 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na alodínia após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

Foram realizados experimentos utilizando os tratamentos laser e soro antibotrópico conjuntamente para se determinar se o tratamento conjunto seria capaz de ter um efeito mais eficaz.

A figura 6 demonstra o tratamento do LBP conjuntamente com o soro antibotrópico após a injeção do veneno de *B. moojeni*. O resultado demonstra que o tratamento conjunto apresentou o mesmo resultado quando os animais foram tratados com o laser sozinho, não apresentando uma melhora significativa na alodínia (Fig. 6).

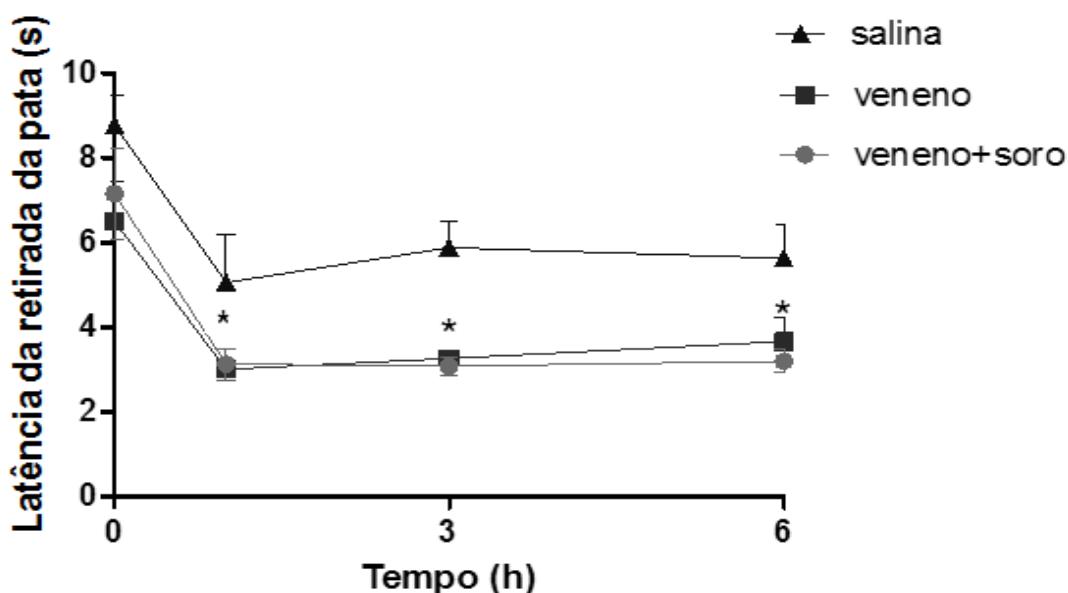


**Figura 6. Efeito do Laser conjuntamente com o soro antibotrópico sobre a alodínia induzida pelo veneno de *B. moojeni*.** A alodínia foi medida pelo limiar da resposta ao estímulo tático avaliado por meio da utilização de filamentos de Von Frey para filamento 3,61 (estímulo alodínio). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção i.pl. do veneno de *B. moojeni* (1 $\mu$ g) ou salina (grupo controle). O soro foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*p< 0,05 em relação ao veneno (ANOVA).

### 3.3.7 Efeitos da neutralização pelo soro antibotrópico na resposta hiperalgésica térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

Os animais foram injetados, por via i.pl. com o veneno de *B. moojeni*, na dose de 1 $\mu$ g ou salina (animais controle), no mesmo volume (50  $\mu$ l). Animais foram tratados com soro antibotrópico (0,2 mL/animal) 30 minutos após a injeção do veneno. O veneno de *B. moojeni* acarretou um aumento da sensibilidade à hiperalgesia térmica, quando comparada à medida inicial (controle). O efeito hiperalgésico foi observado na 3<sup>a</sup> hora após a injeção do veneno, se mantendo elevada até a 6<sup>a</sup> hora (Fig. 7). Animais controle, injetados com salina não apresentaram alterações significativas de sensibilidade à dor, durante o período de experimentação.

Os resultados demonstraram que os animais tratados com o antiveneno não apresentaram redução significativa da sensibilidade à dor térmica quando comparados com animais injetados com veneno nos tempos estudados (Fig. 7).

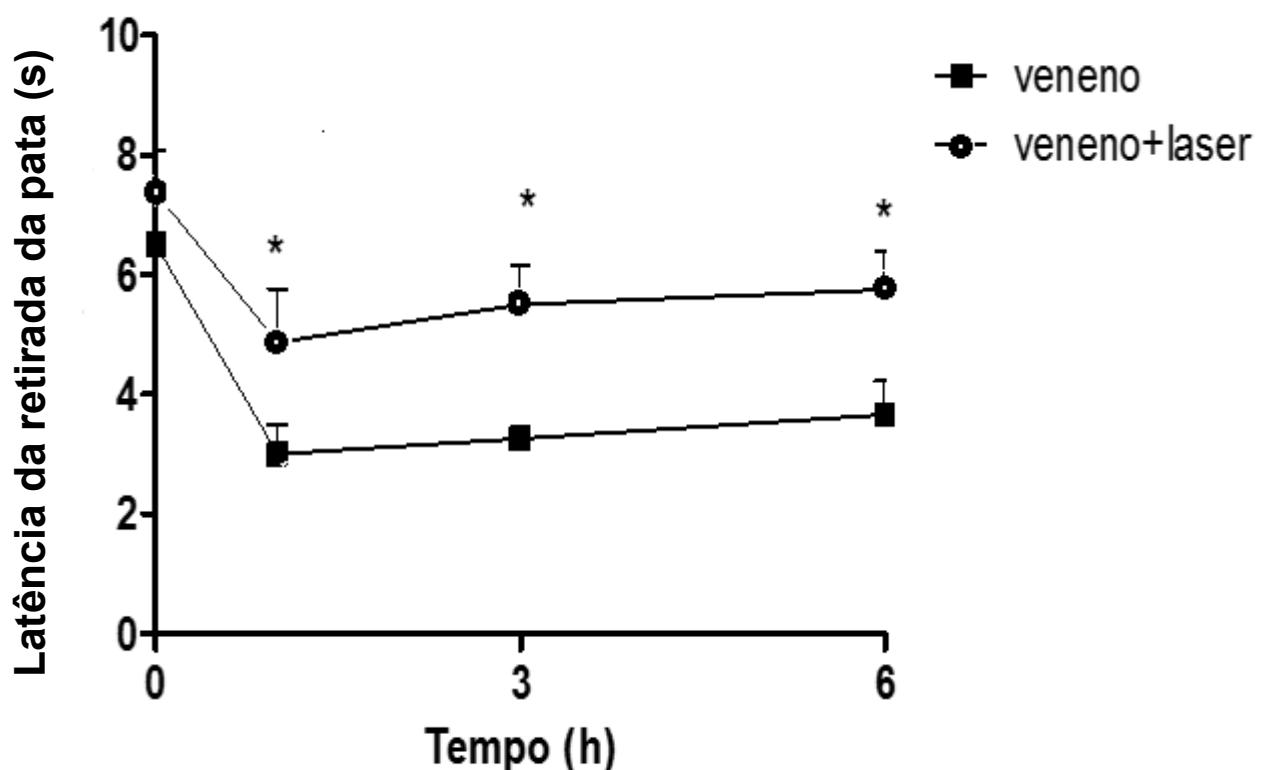


**Figura 7. Efeitos da neutralização pelo soro antibotrópico na resposta hiperalgésica térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* (1 $\mu$ g/pata) ou salina (grupo controle). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3 e 6 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. O soro foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Escores nociceptivos foram avaliados por teste térmico descrito por Hargreaves. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*p< 0,05 em relação à salina (ANOVA).

### 3.3.8 Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta nociceptiva térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

Os animais foram injetados, por via i.pl. com o veneno de *B. moojeni*, na dose de 1 $\mu$ g ou salina (animais controle), no mesmo volume (50  $\mu$ l).

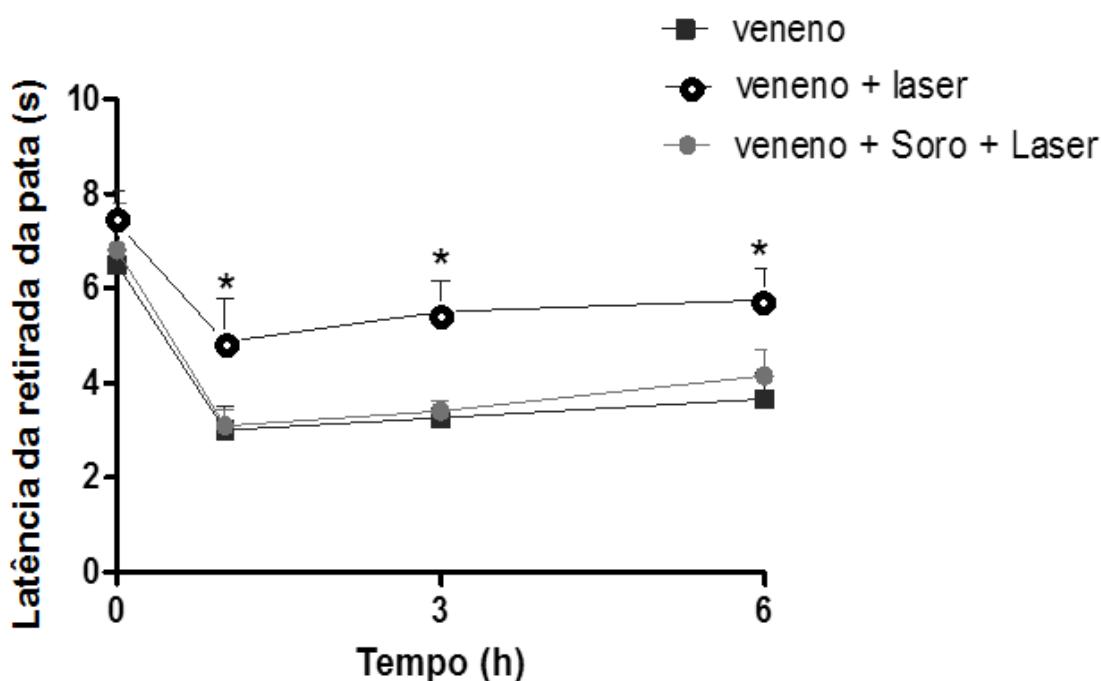
O efeito antinociceptivo do LBP aplicados em dois tempos (meia e terceira hora) após a injeção do veneno demonstrou redução significativa da hiperalgesia térmica nos tempos de 1, 3 e 6 horas, quando comparado ao veneno sozinho (Fig. 8).



**Figura 8. Efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) na resposta nociceptiva térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* (1 $\mu$ g/pata) ou salina (grupo controle). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3 e 6 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. Escores nociceptivos foram avaliados por teste térmico descrito por Hargreaves. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*p< 0,05 em relação ao veneno (ANOVA).

### 3.3.9 Efeitos do laser de baixa potência sozinho e combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

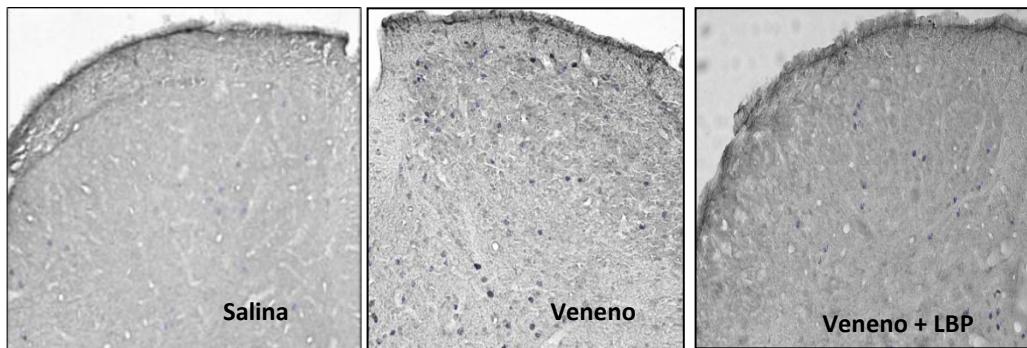
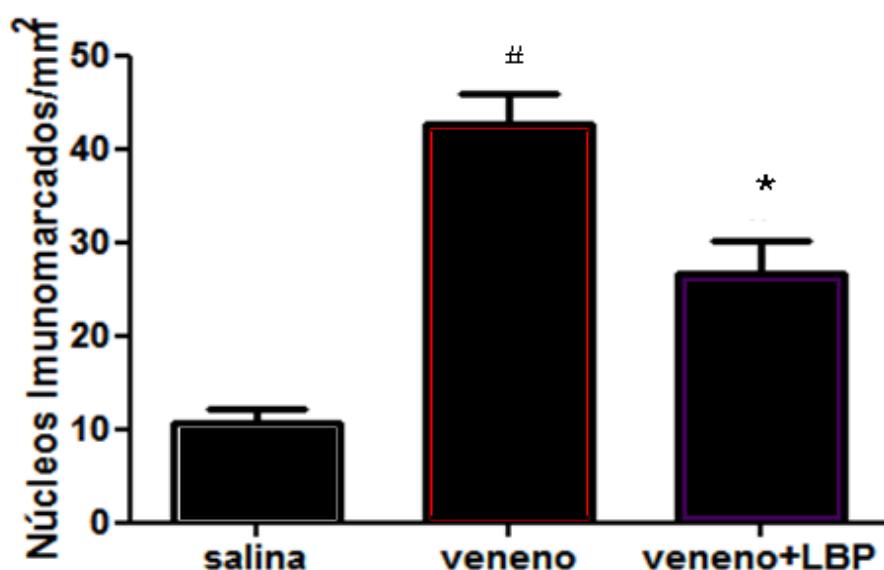
Para avaliar a eficácia da combinação dos tratamentos, os animais foram tratados com o LBP sozinho e conjuntamente com o antiveneno. O efeito antinociceptivo do LBP aplicados em dois tempos (meia e terceira hora) após a injeção do veneno demonstrou redução significativa da hiperalgesia térmica nos tempos de 1, 3 e 6 horas, quando comparado ao veneno sozinho. O tratamento conjunto não apresentou redução significativa da sensibilidade dolorosa, quando comparado com o laser sozinho. Ainda, a combinação de tratamentos não alterou a intensidade ou evolução da resposta hiperalgésica térmica quando comparado com o veneno sozinho (Fig. 9).



**Figura 9.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na hiperalgesia térmica após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* ( $1\mu\text{g/pata}$ ) ou salina (grupo controle). O limiar de dor foi determinado antes (medida inicial, tempo 0) e 1, 3 e 6 horas após a injeção i.pl. do veneno ou salina. O antiveneno foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Escores nociceptivos foram avaliados por teste térmico descrito por Hargreaves. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao veneno (ANOVA).

**3.3.10 Efeito do LBP na ativação neuronal na medula espinal de camundongos submetidos à modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por veneno de *B. moojeni*.**

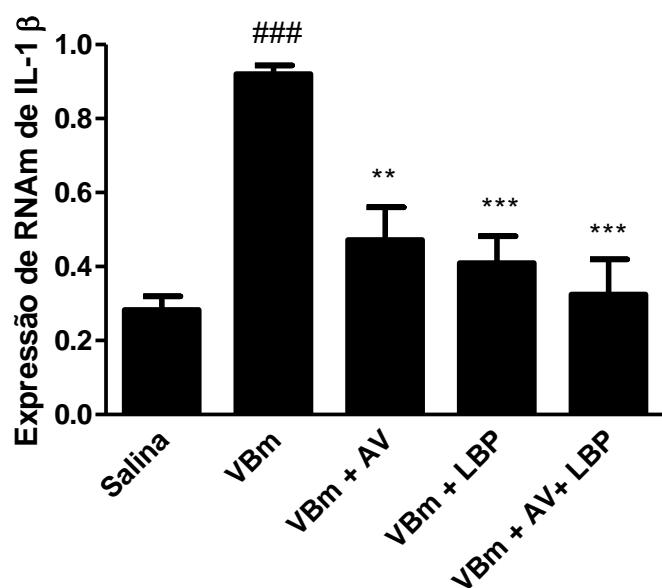
Para verificar se o efeito do laser na diminuição da hiperalgesia induzida pelo veneno teria um efeito central, foi realizado experimento para verificar a ativação neuronal na medula espinal. Para isso, os animais foram injetados, por via i.pl. com o veneno de *B. moojeni*, na dose de 1 $\mu$ g ou salina (animais controle), no mesmo volume (50  $\mu$ l). O efeito antinociceptivo do LBP foi aplicado em dois tempos (meia e terceira hora) após a injeção do veneno e os animais sacrificados 6 horas após. Os resultados demonstraram que o tratamento com LBP diminui em 39% a ativação neuronal induzida pelo veneno de *B. moojeni* na coluna posterior da medula espinal de camundongos (Fig. 10).

**A****B**

**Figura 10 - Efeito do LBP na ativação neuronal na medula espinal de camundongos submetidos à modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por veneno de *B. moojeni*.** Fotomicrografia de secções da coluna posterior da medula espinal submetidas à imunohistoquímica para Fos de camundongos. Escala (-) = 20 µm (A). Quantificação da marcação neuronal pela expressão de Fos em animais (B). Grupos de animais foram injetados com o veneno de *B. moojeni* (1µg/pata) ou salina (grupo controle). A irradiação com o Laser foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. # p <0,01 em relação a salina. \*p< 0,05 em relação ao veneno.

### 3.3.11 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-1 $\beta$ após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

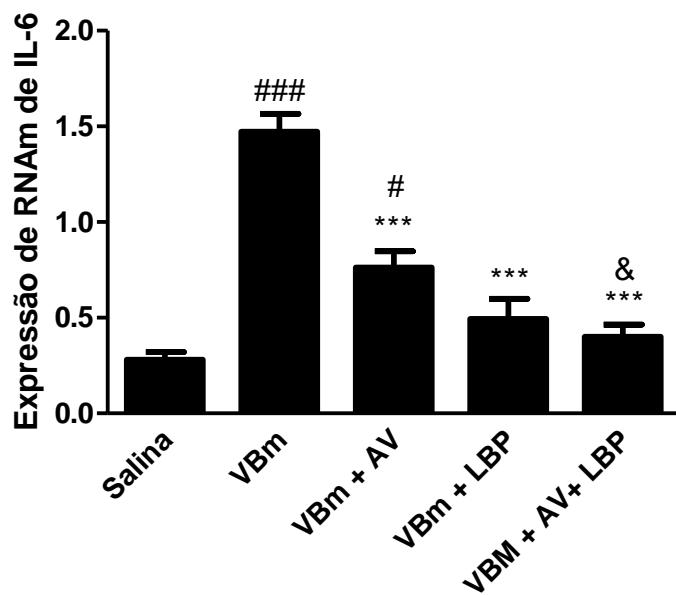
A expressão do RNAm de IL-1  $\beta$  foi avaliada no músculo plantar, no período de 6 h após a injeção i.pl. de VBM ou salina estéril (controle). O veneno causou um aumento significativo da expressão de RNAm IL-1  $\beta$  em relação a animais controle (Fig. 11). Ainda, constatamos o laser reduziu em 66% a expressão RNAm da IL-1 $\beta$  quando comparado ao grupo veneno, o soro antibotrópico, aplicado via i.v. 30 min após a injeção do veneno, teve um efeito semelhante ao causado pelo laser. No entanto, a associação dos tratamentos (laser e AV) causou uma redução de 32% em relação ao tratamento com o AV sozinho.



**Figura 11. Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-1  $\beta$  após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Níveis de expressão RNAm de IL-1 $\beta$  no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBM) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. ### p <0,001 em relação à salina. \*\*p<0,01 em relação ao veneno. \*\*\*p< 0,001 em relação ao veneno.

### 3.3.12 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

A expressão do RNAm de IL-6 foram avaliadas no músculo plantar, no período de 6 h após a injeção i.pl. de VBM ou salina estéril (controle). O veneno causou um aumento significativo da expressão de RNAm IL-6 em relação a animais injetado com salina (Fig. 12). Ainda, constatamos que o tratamento com o LBP reduziu em 67% a expressão RNAm da IL-6 quando comprado ao grupo veneno. O soro antibotrópico, causou uma redução de 49% em relação ao veneno. A associação dos tratamentos (LBP e AV) causou uma redução significativa de 73% em relação ao tratamento com veneno. Ainda, a associação de tratamentos causou uma redução significativa da expressão de IL-6 em relação ao grupo tratado com AV sozinho.

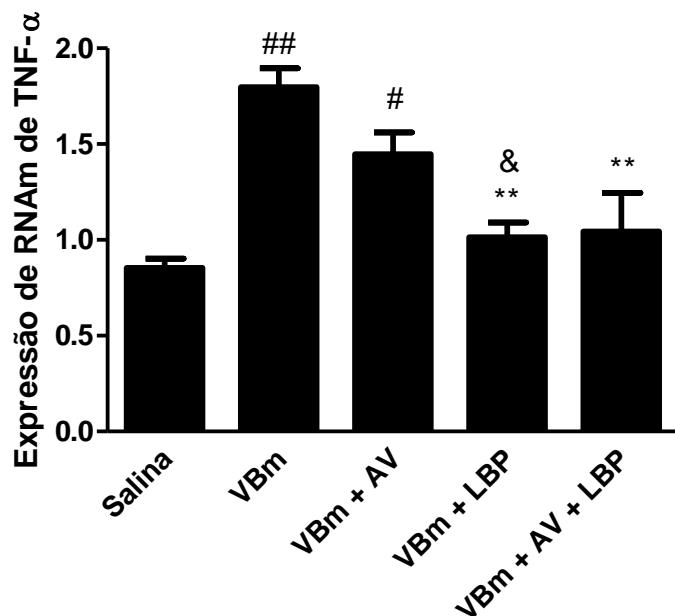


**Figura 12.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Níveis de expressão RNAm de IL-6 no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6 hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBM) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção do veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5

animais por grupo. #  $p < 0,05$  em relação à salina. ###  $p < 0,001$  em relação à salina. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao veneno, &  $p < 0,01$  em relação ao VBm + AV.

### 3.3.13 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

A expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  foram avaliadas no músculo plantar, no período de 6 h após a injeção i.pl. de VBm ou salina estéril (controle). O veneno causou um aumento significativo da expressão de RNAm TNF- $\alpha$  em relação a animais injetado com salina (Fig. 13). O tratamento com o LBP reduziu em 44% a expressão RNAm de TNF- $\alpha$  quando comprado ao grupo veneno. O soro antibotrópico, também causou uma redução de 20 % em relação ao veneno. A associação dos tratamentos (LBP e AV) causou uma redução significativa de 42% em relação ao tratamento com veneno, que não foi diferente dos tratamento sozinhos. Ainda, o tratamento com o LBP causou uma redução significativa em relação ao grupo somente tratado com o AV, de 28% (Fig.13).

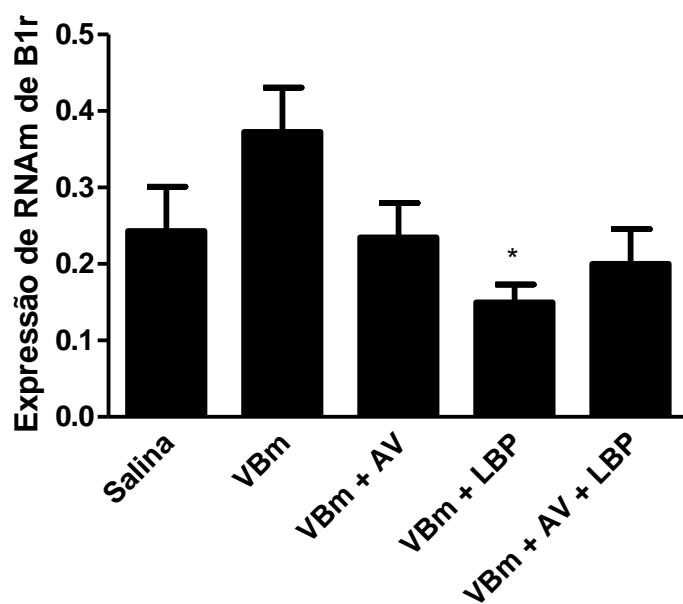


**Figura 13. Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Níveis de expressão RNAm de TNF- $\alpha$  no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5

animais por grupo. #  $p < 0,05$  em relação à salina. ##  $p < 0,01$  em relação à salina. \*\* $p < 0,01$  em relação ao veneno, &  $p < 0,01$  em relação ao VBm + AV.

### 3.3.14 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

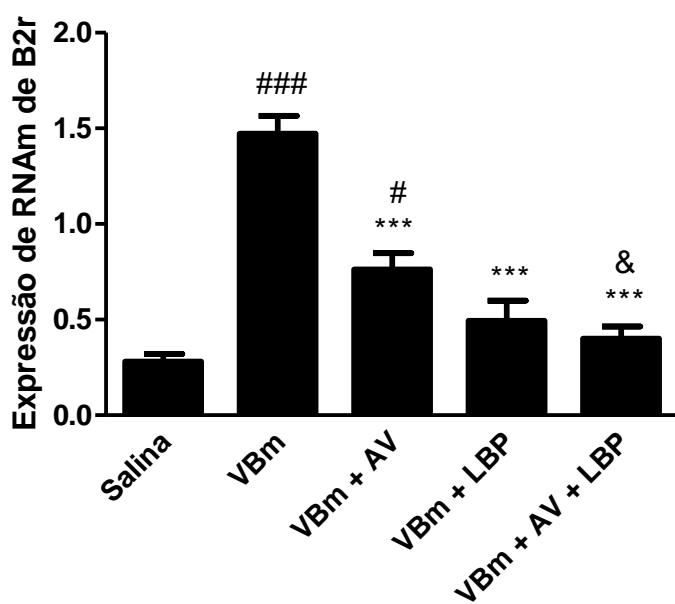
A expressão do RNAm de receptor de bradicinina B1 (B1r) foi avaliada no músculo plantar dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. O LBP foi causou uma redução de 60% da expressão no RNm de B1r em relação ao veneno. O AV administrado sozinho ou conjuntamente com a terapia LBP não teve um efeito na diminuição da expressão no RNAm de B1r (Fig. 14).



**Figura 14. Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de bradicinina B1 após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Níveis de expressão RNAm de receptor de bradicinina B1 (B1r) no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao veneno.

### 3.3.15 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B2 após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

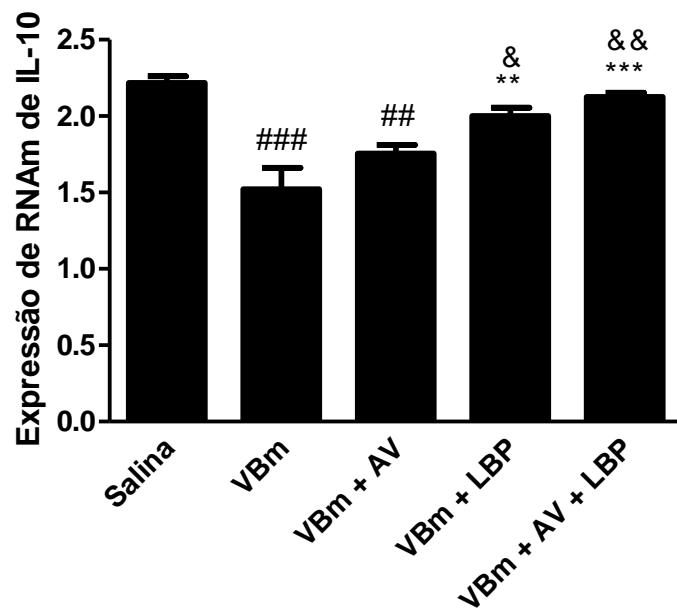
A expressão do RNAm de receptor de bradicinina B2 (B2r) foi avaliada no músculo plantar dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. O veneno causou um aumento significativo da expressão de RNAm B2r em relação a animais injetado com salina (Fig. 15). O tratamento com o LBP sozinho, com o Av sozinho ou o tratamento conjunto (LBP e AV) reduziu em 67, 49 e 79 % a expressão de RNAm de B2r, respectivamente, quando comparado ao grupo veneno. Ainda, o tratamento conjunto do LBP com o AV causou uma redução significativa em relação ao grupo somente tratado com o AV, de 48% (Fig.15).



**Figura 15.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de bradicinina B2 após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Níveis de expressão RNAm de receptor de bradicinina B2 (B2r) no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. # p <0,05 em relação à salina. ### p <0,001 em relação à salina; \*\*\*p< 0,001 em relação ao veneno, &p<0,01 em relação ao VBM + AV.

### 3.3.16 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

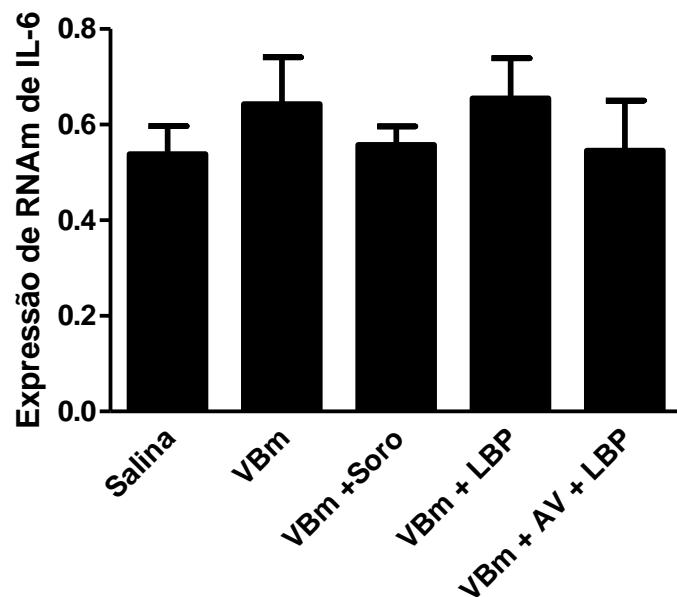
A expressão do RNAm de IL-10 foi avaliada no músculo plantar dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. O veneno causou uma diminuição significativa da expressão de RNAm IL-10 em relação a animais injetados com salina (Fig. 16). O tratamento com o LBP sozinho, com o AV sozinho ou o tratamento conjunto (LBP e AV) aumentou em 31, 15 e 39 % a expressão de RNAm de IL-10, respectivamente, quando comparado ao grupo veneno. Ainda, o tratamento com o LBP ou o tratamento conjunto do LBP com o AV causou um aumento significativo da expressão de RNAm IL-10 em relação ao grupo somente tratado com o AV, de 13 e 18%, respectivamente (Fig.16).



**Figura 16.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Níveis de expressão RNAm de IL-10 no músculo plantar foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. ## p <0,01 em relação à salina. ### p <0,001 em relação à salina. \*\*p< 0,01 em relação ao veneno; \*\*\*p< 0,001 em relação ao veneno; & p<0,01 em relação ao VBm + AV; && p<0,001 em relação ao VBm + AV,

**3.3.17 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.**

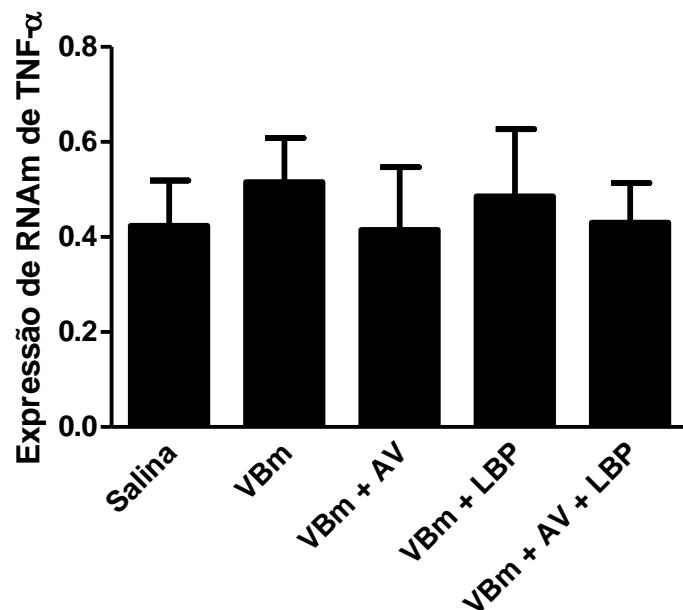
A expressão do RNAm de IL-6 foi avaliada na medula espinal dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. Verificamos que o VBm não alterou a expressão de RNAm de IL-6 na medula espinal dos camundongos. Da mesma maneira, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a expressão desta citocina (Fig. 17).



**Figura 17. Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-6 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Níveis de expressão de RNAm de IL-6 na medula espinal foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6 hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo.

**3.3.18 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  em medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.**

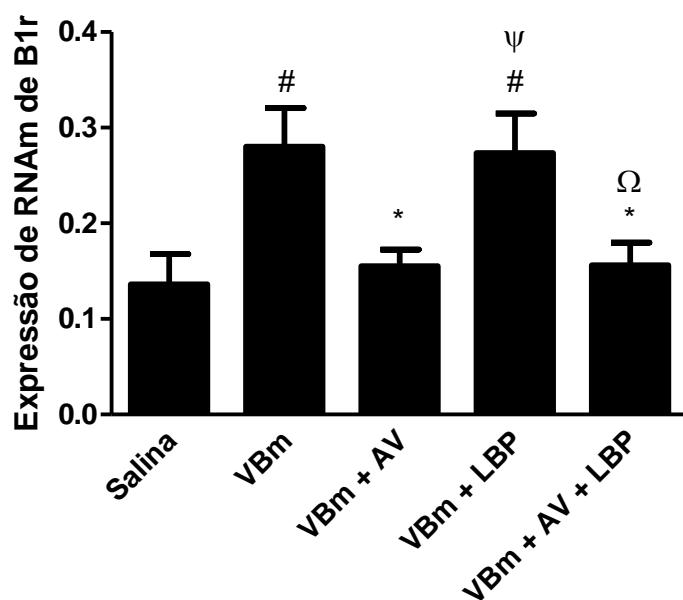
A expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  foi avaliada na medula espinal dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. Verificamos que o VBM não alterou a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  na medula espinal dos camundongos. Da mesma maneira, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a expressão desta citocina (Fig. 18).



**Figura 18. Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.** Níveis de expressão RNAm de TNF- $\alpha$  na medula espinal foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBM) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo.

### 3.3.19 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de Bradicinina B1 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

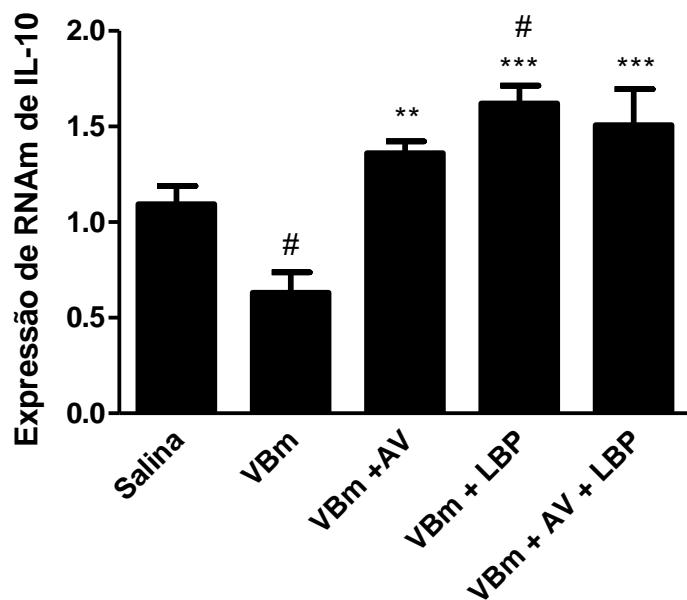
A expressão do RNAm de receptor de bradicinina B1 (B1r) foi avaliada na medula espinal dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. Verificamos que o VBm causou um aumento da expressão deste receptor que foi 45 % maior que o grupo controle. O tratamento com o LBP não modificou a expressão do B1r. No entanto, observamos que o tratamento com o AV assim como o tratamento conjunto do LBP com o AV reduziu a expressão do RNAm de B1r em 45% para ambos os tratamentos (Fig. 19).



**Figura 19.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de receptor de bradicinina B1na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Níveis de expressão RNAm de receptor de bradicinina B1 (B1r) na medula espinal foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. . #p< 0,05 em relação à salina; \*p< 0,05 em relação ao veneno. ψ p< 0,05 em relação ao VBm+ AV. Ωp< 0,05 em relação ao VBm + LBP.

### 3.3.20 Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*.

A expressão do RNAm de IL-10 foi avaliada na medula espinal dos camundongos, 6 horas após a injeção do veneno *B. moojeni* (VBm) ou solução salina. O veneno causou uma diminuição de 43% da expressão de RNAm IL-10 em relação a animais injetado com salina (Fig. 20). O tratamento com o LBP sozinho, com o AV sozinho ou o tratamento conjunto (LBP e AV) aumentou em 156, 115 e 139 % a expressão de RNAm de IL-10, respectivamente, quando comparado ao grupo veneno. Ainda, o tratamento com o LBP ou o tratamento conjunto do LBP com o AV causou um aumento significativo da expressão de RNAm IL-10 em relação ao grupo somente tratado com o AV, de 13 e 18%, respectivamente (Fig.20).



**Figura 20.** Efeitos do laser de baixa potência combinado com o soro antibotrópico na expressão do RNAm de IL-10 na medula espinal após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Níveis de expressão RNAm de IL-10 na medula espinal foram avaliados por ensaio de PCR em tempo real, 6hs após a injeção do veneno de *B. moojeni* (VBm) ou salina (controle). O antiveneno (AV) foi administrado (i.v) 30 min após a injeção de veneno. A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) foi realizada em duas aplicações através da fibra óptica: meia e 3 horas após a injeção do veneno. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. # p <0,05 em relação à salina. \*\*p< 0,01 em relação ao veneno. \*\*\*p<0,001 em relação ao veneno.

#### 4. DISCUSSÃO

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem um importante problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo. As serpentes responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos, na América Latina, pertencem à família *Viperidae* e ao gênero *Bothrops* (HOGE *et al.*, 1979). O quadro clínico observado pelo envenenamento botrópico pode ser dividido em sistêmico e local (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1989). Atualmente, o tratamento preconizado para o acidente ofídico botrópico é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico. No entanto, o antiveneno botrópico não reverte, com eficiência, o efeito local induzido pelo veneno do gênero *Bothrops* (ZAMUNER *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 1993). Algumas alternativas têm sido propostas por muitos pesquisadores como tratamento coadjuvante ao antiveneno, tais como o uso de anticorpos recombinantes humanos e o uso de uma ampla variedade de componentes de plantas (PEREIRA *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2007; NÚÑEZ *et al.*, 2004). Evidenciando a busca de alternativas para o tratamento do efeito local induzido pelo veneno botrópico, destacando-se a reação inflamatória e a mionecrose que ocorre de maneira rápida e intensa.

A habilidade que os venenos de serpentes têm de induzir um processo inflamatório agudo, já foi reportada por diversos autores (BARRAVIERA, 1993; ROSENFELD, 1971), e a inflamação induz um aumento na sensibilização dos nociceptores à estimulação mecânica, térmica ou química, que se manifesta com a dor inflamatória (FERREIRA, 1980). Nossos resultados demonstraram que o veneno de *B. moojeni* causou resposta hiperalgésica e alodínia máxima observado na 1<sup>a</sup> hora após a injeção do veneno se mantendo elevada até a 24<sup>a</sup> hora. Estes dados são análogos aos encontrados por Chacur *et al.* (2001), que ao inocular na pata de ratos o veneno de *B. asper*, verificou que esse veneno causa hiperalgesia de maneira dose-tempo dependente, detectada por teste de pressão na pata e que a hiperalgesia é mediada, pelo menos em parte, por bradicinina, atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> e leucotrienos. Em geral o teste mecânico por pressão de pata, é utilizado para estimar a hiperalgesia inflamatória, avaliando o aumento da sensibilidade da dor devido à ação de mediadores químicos nos nociceptores, nos quais estão envolvidos o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas 1, 6 e 8, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (FERREIRA *et al.*, 1993; CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*,

1988). A inflamação resulta da liberação de milhares de substâncias, algumas das quais são neuroativas. Algumas destas substâncias estimulam nociceptores quimiossensíveis por meio dos quais desempenham papel importante no desenvolvimento da inflamação (COUTAUX *et al.*, 2005). Quando analisamos os níveis de transcrição de RNAm que traduz a IL-6, IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  os nossos experimentos demonstram que houve uma ativação na transcrição destas citocinas após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Além disso, já foi bem estabelecido que as cininas, como a bradicinina, são peptídeos pró- inflamatórios que regulam uma variedade de respostas fisiológicas através da estimulação de 2 subtipos de receptores B1 e B2 (CALIXTO *et al.*, 2004). Nossa trabalho avaliou os níveis de transcrição de RNAm destes dois subtipos de receptores (B1 e B2), onde o veneno de *B. moojeni* aumentou a expressão do receptor B2.

Através do teste mecânico, verificou-se que o veneno causou hiperalgesia que se manteve constante em todos os tempos avaliados. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Chacur *et al.* (2002), que ao administrar o veneno de *B. jararaca* na pata de ratos, obtiveram hiperalgesia, que foi mensurada através deste mesmo teste. Ainda, nossos resultados demonstram que o veneno de *B. moojeni* causou hiperalgesia térmica da primeira à 6 hora da injeção do veneno. Resultado semelhante foi encontrado por Bonavita *et al.*, (2006) quando utilizou o veneno de *B. jararaca* no mesmo modelo experimental. A sensibilidade avaliada pelo teste de placa quente é um modelo utilizado para avaliar a nocicepção supraespinal (DALE *et al.*, 2006). O modelo de hiperalgesia térmica, de forma semelhante a da mecânica, depende da inflamação e é indiretamente iniciada por um segundo estímulo exógeno, o estímulo térmico, o que induz a hiperalgesia (HARGREAVES *et al.*, 1988), este modelo envolve principalmente a ativação dos receptores NMDA, a proteína quinase C e a produção de óxido nítrico e do GMP cíclico na coluna vertebral (MELLER *et al.*, 1994). No entanto, não avaliamos qual seria o receptor envolvido na hiperalgesia térmica induzida pelo veneno de *B. moojeni*.

Estudos pioneiros realizados por TEIXEIRA *et al.* (1994) demonstraram que a peçonha de *Bothrops jararaca* acarreta hiperalgesia em ratos, mediada, ao menos em parte, por prostaglandinas, leucotrienos e PAF. Estes dados indicam, adicionalmente, a importância da atividade fosfolipásica e da geração de mediadores lipídicos para a indução da reação local, neste caso, da hiperalgesia.

Há aproximadamente uma década, Hunt *et al.*(1987) descreveram a expressão do gene c-fos e seu produto proteico, a proteína Fos, em neurônios do corno dorsal da medula espinal, lombar, de ratos, submetidos à estimulação nociva. Desde então, a análise da expressão da proteína Fos tem sido utilizada em estudos das bases neurais da nocicepção. Existem evidências crescentes da existência de uma relação entre a expressão da proteína Fos, induzida por estímulo nocivo e a modulação, por longo tempo, dos processos nociceptivos espinais. Esses processos resultariam em alterações nos circuitos nociceptivos espinais (neuroplasticidade à dor patológica), promovendo o aumento da sensibilidade ao estímulo nocivo (hiperalgesia) ou a estímulos não nocivos (alodínia) (CODERRE *et al.*, 1993). Nossos estudos demonstram que o veneno de *B. moojeni* causou um aumento da ativação neuronal na medula espinal de camundongos. Em ratos, a aplicação de estímulo elétrico nocivo em pata anterior e posterior provocou o aparecimento de c-Fos em células localizadas no corno ventral da medula espinal destes animais (LOWRENCE *et al.*, 2004).

O Laser têm se mostrado um instrumento auxiliar tão importante, que várias pesquisas de suas possíveis aplicações estão sendo realizadas nos mais diversos pontos do mundo, como terapia alternativa nas mais diversas áreas da medicina, odontologia, encontrando-se com maior evidência em dermatologia, cirurgia plástica, fisioterapia, estética, tratamentos vasculares entre outros.

Neste estudo, o Laser utilizado foi o Arseneto de Gálio (Ga-As), na região do vermelho (685 nm) com densidade de energia de 2,2 J/cm<sup>2</sup>. A escolha destes parâmetros foram feitas com base em estudos anteriores do nosso laboratório que mostra que a irradiação mais efetiva está na escala do vermelho e infravermelho próximo ao espectro, onde as fontes mais utilizadas são o laser de helio-neôneo (HeNe com radiação até 632,8 nm), laser Galio-Alumíneo (Ga-Al – 630-685nm), laser Arseneto de Helio-Neôneo (He-Ne-As – 780-870 nm) e o laser Arseneto de Galio (Ga-As – 904 nm) (DOURADO *et al.*, 2003). A principal razão para se utilizar diferentes irradiações na região do vermelho e infravermelho próximo, está no fato de que a hemoglobina não absorve nesta região e a luz pode penetrar profundamente no tecido (VLADIMIROV *et al.*, 2004).

O tratamento do laser de baixa potência foi realizado 30 min e 3 hs após a injeção do veneno, esse protocolo foi realizado para verificar se o LBP seria capaz de inibir ou reduzir a dor inflamatória mesmo depois dos sintomas estarem instalados.

Nossos resultados demonstram que o LBP reduziu a hiperalgesia mecânica e a alodínia causada pelo veneno. Estudos recentes demonstraram que o laser de baixa potência foi capaz de reduzir a hiperalgesia e alodínia após injeção do veneno de *B. jararacussu* (GUIMARÃES-SOUZA *et al.*, 2011), o que corrobora com os nossos resultados. Ademais, neste estudo o LBP foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida pelo veneno. O exato mecanismo de redução da dor pela terapia a laser não está completamente elucidado. Alguns estudos têm sugerido que a irradiação laser poderia produzir analgesia agindo nos canais de K<sup>+</sup> (JAMES *et al.*, 2001), outro estudo mostrou que a irradiação laser não induz um efeito foto físico, agindo diretamente sobre as mitocôndrias sem qualquer efeito sobre o mecanismo celular (KARU *et al.*, 1988). Além disso, estudos têm sugerido que a inibição da atividade neuronal poderia ser responsável pelo efeito terapêutico e que a irradiação laser inibe de forma seletiva sinais nociceptivos dos nervos periféricos (TASCIÖGLU *et al.*, 2004). Também Honmura *et al.* (1993), sugeriram que os efeitos anti-inflamatórios, em inflamação aguda de patas de ratos induzida por carragenina, do laser (Ga-Al-As 780 nm, 10 mW, 31,8 J/cm<sup>2</sup>, 30s cada ponto irradiado durante 3 minutos) seja induzido pelo menos parcialmente por certos mecanismos que não envolvam a secreção de opióides endógenos. Adicionalmente, Ferreira *et al.* (2005), utilizando um modelo de hiperalgesia induzida por carragenina demonstrou que o efeito analgésico causado pelo laser (HeNe 632,8 nm, 2,5 J/cm<sup>2</sup>) não envolve um receptor opioide periférico, mas envolve tardivamente eventos de liberação de PGE<sub>2</sub> durante a inflamação aguda. Devido à importância das prostaglandinas no processo inflamatório, a interferência em sua síntese determina sensível redução nas alterações proporcionadas pela inflamação, inclusive a dor. A inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos anti-inflamatórios não hormonais existentes (VANE *et al.*, 1971) e também já foi demonstrado que o LBP inibe a liberação de PGE<sub>2</sub> em modelo de artrite (PALLOTA *et al.*, 2012). Assim, é possível que em nosso modelo, o efeito analgésico do laser seja devido à inibição da liberação de PGE<sub>2</sub>. Neste sentido, foi mostrado, que os venenos de *B. jararaca* e *B. asper* causam aumento da liberação de PGE<sub>2</sub> via COX-2 e que esse aumento deve contribuir para a formação de edema por esses venenos (OLIVO *et al.*, 2007).

O tratamento conjunto do LBP com o antiveneno não foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica, em nosso modelo experimental, este resultado é curioso, pois nos modelos de hiperalgesia mecânica e alodínia o antiveneno não modificou a ação

do LBP. É possível que a resposta imune do soro tenha alterado a capacidade do LBP em neutralizar a ação local do veneno na hiperalgesia térmica, provavelmente por ser uma ativação central diferente da mecânica, que é local.

Para verificar a possível ação sistêmica do LBP, avaliamos se, em nosso modelo experimental, o tratamento seria capaz de modular a ativação neuronal de um mediador de dor na medula espinal. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o LBP diminui a ativação neuronal induzida pelo veneno de *B. moojeni* na coluna posterior da medula espinal de camundongos. O padrão de expressão de c-Fos ou seu produto Fos depende do tipo de estímulo e de sua duração. Coggeshall (2005) divide o padrão de expressão de Fos em agudo e crônico. No presente trabalho monitoramos a imunomarcação para Fos 6 horas após injeção de veneno da *B. moojeni*, consideramos que neste intervalo de tempo o processo inflamatório agudo estava instalado e o produto proteico Fos já havia atingido níveis detectáveis imunohistoquimicamente. O laser mostrou-se capaz de modular a hipernocicepção a níveis centrais e não somente a níveis periféricos. Não existem dados na literatura sobre a modulação de c-Fos pelo laser, no entanto, já foi hipotetizado que os fótons endógenos agem como um mecanismo de sinalização para a regulação de vias neurais da periferia para o córtex de modo integrado, para ajudar a coordenar a resposta do organismo em resposta a estímulos internos e externos (LIEBERT *et. al.*, 2014).

Na tentativa de investigar o mecanismo pelo qual o laser reduz o efeito hiperalgésico induzido pelo veneno, avaliamos a expressão de mediadores inflamatórios envolvidos no processo, como citocinas pró e anti-inflamatórias. Verificamos que o LBP foi eficaz em reduzir níveis de transcrição de RNAm que traduz as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ , assim como os receptores de bradicinina B1 e B2. Ainda, o laser foi capaz de aumentar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, no músculo plantar de camundongos. Esses resultados estão de acordo com a literatura que mostra que o laser é capaz de modular a expressão de várias citocinas em vários modelos experimentais, tais como IL-1 e IL-6 (CARLOS *et. al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013), IL-10 (XAVIER *et. al.*, 2014) e TNF- $\alpha$  (OLIVEIRA *et. al.*, 2013). Ainda, o laser foi capaz de diminuir a expressão gênica de receptores de bradicinina 1 e 2 em modelo experimental de edema de pata em rato (BORTONE, *et. al.*, 2008). Esses autores sugerem que essa diminuição deve contribuir para a redução do processo inflamatório. Baseados nesses dados, podemos sugerir que o

LBP esteja diminuindo a dor, bem como o processo inflamatório causado pela injeção do veneno, pelo menos em parte, por inibir os mediadores pró-inflamatórios e aumentar os níveis de mediadores anti-inflamatórios envolvidos neste efeito. Essa hipótese é reforçada pelo fato de vários trabalhos na literatura mostrarem um aumento destes mediadores no processo inflamatório local induzido por venenos botrópicos (MOREIRA *et al.*, 2013; ZAMUNER *et al.*, 2002; CHACUR *et al.*, 2001).

A terapia com o laser de baixa potência como tratamento anti-inflamatório foi capaz de reduzir o processo inflamatório em diferentes modelos experimentais. Por este motivo, utilizamos o LBP no tratamento do envenenamento botrópico e como coadjuvante à soroterapia na neutralização das ações causadas por este veneno, uma vez que o tratamento somente com o antiveneno não neutraliza as ações locais do envenenamento botrópico. Portanto, os resultados apresentados vêm reforçar que os tratamentos com laser de baixa potência e com os LEDs devem ser considerados como uma abordagem terapêutica para o tratamento dos efeitos locais do envenenamento botrópico.

## 5. CONCLUSÃO

Através deste estudo concluímos que o veneno bruto de *B. moojeni*, na dose utilizada, foi capaz de induzir um intenso efeito hiperalgésico mecânico e térmico, em pata de camundongos. O soro antibotrópico não neutralizou o efeito hiperalgésico mecânico e térmico e também o alodínia, causado pelo veneno. Entretanto, os tratamentos com o laser, com o LED vermelho e infravermelho aplicados 30 min e 3 horas após a injeção do veneno foram eficazes em inibir o comportamento nociceptivo induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni* em camundongos. A combinação de tratamentos da terapia de baixa potência com o soro antibotrópico também apresentou efeito na redução da sensibilidade dolorosa.

Nossos resultados sugerem que a redução do efeito hiperalgésico do LBP acontece por diminuir a ativação neuronal de c-Fos, induzida pelo veneno de *B. moojeni*, na coluna posterior da medula espinal de camundongos. Ainda, a modulação dos níveis de transcrição de RNAm de citocinas pró e anti-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-10 e dos receptores de bradicinina B1 e B2 deve, ao menos em parte, contribuir pela diminuição da hiperalgesia.

Ainda, neste trabalho, avaliamos o efeito do laser no edema induzido pela miotoxias isoladas do veneno de *B. Moojeni*. As miotoxinas MjTX-I e MjTX-II induziram efeito edemato-gênico na pata de camundongos, sendo a MjTX-II mais potente que a MjTX-I na indução deste efeito. O tratamento com os LEDs aplicados 30 min e 3 h após a injeção das miotoxinas foi efetivo na redução do edema induzidos pelo MjTX-I e MjTX-II. Ainda, verificamos que a combinação do soro antibotrópico com o LED não melhorou o efeito da terapia de baixa potência sozinha.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.
- ALOISI, A. M.; ALBONETTI, M. E.; LODI, L.; LUPO, C.; CARLI, G. Decrease of hippocampal choline acetyltransferase activity induced by formalin pain. **Brain Res.**, v. 629, p. 167-170, 1993.
- ALTIER, C; ZAMPONI, G. W. Targeting  $\text{Ca}^{2+}$  channels to treat pain: T-type versus N-type Trends. **Pharmacol Sci**, 25: 465-70, 2004.
- AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 23: 877-85, 1985.
- ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P. G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. **Annu Rev Physiol**, 63: 795-813, 2001.
- ASSAKURA M. T., REICHL, A. P., ASPERTI, M. C. A.; MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v.23, p. 691-706, 1985.
- BARBOSA, A.M; VILLAVERDE, A.B; GUIMARÃES-SOUZA, L; RIBEIRO, W; COGO, J.C; ZAMUNER, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, 51, p.1236-1244, 2008.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos: Revisão. **JBM**, São Paulo, v. 65. n. 4, p. 209-250, 1993.
- BARRES, B. A. New Roles for glia. **J. Neurosci**, 11: 3685-94, 1991.
- BAXTER, G. D. **Therapeutic laser**: Theory and practice. [s.l.]: Churchill Livingstone,, p. 1-19, 1997.
- BELKIN, M.; ZATURUNSKY B.; SCHWARTZ, M. A critial review of low energy laser bioeffects. **Lasers Light Ophthalmol**. v. 2, p. 63-71, 1988.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BONAVITA A.G.C., DA COSTA A , PIRES ALA, NEVES-FERREIRA A.G.C., PERALES J., CORDEIRO R.S.B., MARTINS M.A., SILVA P.M.R. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, 47: 885–893, 2006.
- BORTONE. F.; SANTOS, H. A.; ALBERTINI, R.; PESQUERO, J.B.; COSTA, M. S.; SILVA JR, J.A. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. **International Immunopharmacology**.8, 206–210, 2008.
- BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast, p. 356, 1998.
- BULLITT, E. Somatotopy of spinal nociceptive processing. **J Comp Neurol**. v. 312, p. 279-290, 1991.

- BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **J. Comp. Neurol.** 296: 517-30, 1990.
- BURITOVA, J; HONORE, P; BESSON, JM. Indomethacin reduces both Krox-24 expression in the rat lumbar spinal cord and inflammatory signs following intraplantar carrageenan. **Brain Res.** 674: 211-20, 1995.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 15, 2000.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D.A.; CAMPOS, M.M. Kinin B1 receptors: key G- protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology** 143, 803-818, 2004.
- CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.
- CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J.A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J Clin Laser Med Surg.** v. 16, p. 317-320, 1998.
- CARDOSO, J. L. C., et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the tratament of evenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993.
- CARLOS, F.P.; SILVA, M.P.A.; MELO, E.L.V.S.; COSTA, M. S.; ZAMUNER, S. R. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. **Lasers in Medical Science**, Doi:10.1007/s10103-013-1413-3, 2013.
- CASTEX, J.; FIORAMONTI, J.; FARGEAS, M. J.; BUENO, L. c-fos expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT3 receptors and vagal afferent fibers. **Brain Res.**, 688, pp. 149–160, 1995.
- CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS T.O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 490-497, 2007.
- CHACUR, M.; PICOLLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, Grã-Betanha, v. 39, p. 1173--1181, 2001.
- CHACUR, M.; PICOLLO, G.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *B. jararaca* venom. **Toxicon**, 1047-1051, 2002.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.
- CHAVES, F., et al. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: comparison between Fab and IgG. **Toxicon**, v. 41, p. 237-244, 2003.

- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCINA, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZOÀ, P.; CARMIGNOTO, G.; ANGULOC, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **PNAS**, August 10, vol. 107, no. 32 14140–14145, 2010.
- CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARINO, A. L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52: 259-285, 1993.
- COGGESHALL, R. E. Fos, nociception and the dorsal horn. **Prog. Neurobiol.**, v. 77, p. 299-352, 2005.
- COLBURN, R. W. & DELEO, J. A. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Brain Res Bull**, 49: 419-27, 1999.
- COLLARES-BUZATO, C. B.; SUEURLE, L. P.; CRUZ-HOFLING, M. A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.181, p.124-132, 2002.
- COUTAUX, A; ADAM, F; WILLER, J.C; BARS, D.L. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**: 72, 359-371, 2005.
- CUNHA FQ, POOLE S, LORENZETTI BB, FERREIRA SH. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharm**; 107: 660-4, 1992.
- DALE, C.S; PAGANO, R.L; PACCOLA, C.C; PINOTTI-GUIRAO, T; JULIANO, M.A; JULIANO, L; GIORGIO, R. Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. **Peptides**: 27, 2794-2802, 2006.
- DA SILVA, J.O.; FERNANDES, R.S.; TICLI, F.K., OLIVEIRA, C.Z.; MAZI, M. V.; FRANCO, J.J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n.2, p. 283-291, 2007.
- DEL BEL, E. A.; TITZE-DE-ALMEIDA, R.; SHIDA, H.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CORRÊA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S. Induction of the c-fos proto-oncogene in the rat pineal gland during stress. **Braz J Med Biol Res** 26: 975-981, 1993.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V.; CAMPOS, A. C. M. R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Complement activation by animal venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 14, p. 375-400, 1995.
- DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M. A. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers surg Med**. 33:352-357, 2003.
- DRAY, A. Tasting the inflammatory soup role of peripheral neurons. **Pain Rev**. v.1, p.153-171, 1994.
- DRAY, A. The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer, 130: 21-41, 1997.

- DRAY, A.; PERKINS, M. N. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, 16:99- 104, 1993.
- EL SAYED, S.A.; DYSON, M. Comparisson of the effect of multiwavelength lightproduced by a clister of semicondutor diodes each individual diode on master cell numberand phosphorus metabolism. **Laser Surg Méd.**, v.10, p. 559-568, 1990.
- ESMERALDINO, L. E.; SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v. 12, p. 570-576, 2005.
- FARSKY, S. H. P.; COSTA-CRUZ, J. W. M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. Leokocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, 35:185-93, 1997.
- FERREIRA, D. M.; ZANGARO, R. A.; VILLAVERDE, A. B.; CURY, Y.; FRIGO, L.; PICOLLO, G.; LONGO, I.; BARBOSA, D. G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, p.177-181, 2005.
- FERREIRA, M. L., MOURA-DA-SILVA, A. and MOTTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* ativenom. **Toxicon**, v.30, p. 1591-1602, 1992.
- FERREIRA, S.H. Peripheral analgesis action of aspirin like drugs and opiate-antagonists. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 10: 2375-2455, 1980.
- FERREIRA SH, LORENZETTI BB, BRISTOW AF, POOLE S. Interleukin-1b as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**; 334:698–700, 1988.
- FERREIRA, S.H.; LORENZENTTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hiperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**; v.110, p. 1227-1231, 1993.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal Cord. **Brain Research Bulletin**, v.48. p. 129-141, 1999.
- FURTADO, M. F. D.; COLLETTI, G. M. D. D.; DIAS da SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. 1. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas á temperatura ambiente ou liofilizado. **Men. Inst. Butantan**, v.53, p. 149-159, 1991.
- GALVÃO, N. N.; SAMPAIO, M. C.; AMARAL, O. R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the o edema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-352, 2010.
- GARCIA- LEME, J. Hormones and inflammation. Boca Raton: CRC Press, p. 283, 1989.
- GENOVESE, W. J. Laser de Baixa Intensidade. Aplicações Terapêuticas em Odontologia. São Paulo: Lovise, 2000.

- GOGAS, KR; PRESLEY, RW; LEVINE, JD; Basbaum, AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. **Neuroscience**, 42: 617-28, 1991.
- GUIMARAES-SOUZA, DALE C.S., NADUR-ANDRADE N., BARBOSA A M, COGO J.C., ZAMUNER S.R. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Clin Exp Med Lett**; 52(3-4): 97-102, 2011.
- GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**. 26 (4):411–413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p.841-850, 2000.
- GUTIÉRREZ JM, THEAKSTON RDG, WARRELL DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med** 3: e150, 2006.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. **Pain**. 32(1):77-88, 1988.
- HARRIS, J. A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. **J. Physiol Paris**. 90(1):15-25, 1996.
- HARRIS, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain Res. Bull.** 45: 1-8, 1998.
- HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol**, v.29, p. 1-19, 1999.
- HAYDON, P. G. Glia: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci**. Mar; 2(3):185-93, 2001.
- HERDEGEN, T.; KOVARY, K.; LEAH, J.; BRAVO, R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious trans synaptic stimulation. **J Comp Neurol**, 313: 178-91, 1991.
- HERDEGEN, T.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res Brain Res Rev**, 28: 370-490, 1998.
- HERMANSON, O.; BLUMQVIST, A. Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. **J. Comp. Neurol**. 368: 45-56, 1996.
- HOGE, A. R.; ROMANOHOGE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v.42/43, p. 373-396, 1978/1979.
- HONKANIEMI, J. Colocalization of peptide- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities with Fos-immunoreactive neurons in rat central amygdaloid nucleus after immobilization stress. **Brain Res**. 598(1-2):107-13, 1992.

- HONMURA, A.; ISHII, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Med.**;13 (4):463-9, 1993.
- HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, 328: 632-4, 1987.
- JAMES, M. J.; PENGLIS, P. S.; CAUGHEY, G. E.; DEMASIL, M.; CLELAND, L.G. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? **Inflamm. Res.**, v.50, p.249–253, 2001.
- JESSEL, TM; KELLY, DD. Pain and Analgesia, in Principles of Neural Science, Ed. Kandel, Schwartz e Jessel, Ed.Elsevier, pp. 385-99, 3a. ed.,1991,
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T.M. **Princípios da Neurociência**. 4. Ed. São Paulo. Manole, p.473-491, 2003.
- KARU, T. I. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low power intensity laser radiation. **Laser Life Sci.**, v.2, p.53-74, 1988.
- KARU, T.I. Photobiology of low laser effect. **Healt Physiol.** v. 56, p. 691-704, 1989.
- KARU, T. I.; PYATIBRAT. L.V.; RYABYKH, T. P. Melatonin modulates the action of near infrared radiation on cell adhesion. **J. Pineal Res.**, v.34, p. 167-172, 2003.
- KEAY, K. A.; CLEMENT, C. I.; DEPAULIS, A; BANDLER, R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. **Neurosci Lett.**, v. 313, p. 17-20, 2001.
- KITCHEN, S. S., PARTRIDGE, C. H. A review of low level laser therapy parts I: Background, Physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n.3, p.161 – 163, 1991.
- KOUYOUMDJIAN, J.A., POLIZELLI, C. Snake bites caused by *Bothrops moojeni*: report of 37 cases. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 30, 624–632, 1988.
- KOUYOUMDJIAN, J. A., POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 31, p. 84-90, 1989.
- KOUYOUMDJAIN, J.A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S.M.; GUIMARAES, S.M. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 85: 552, 1991.
- LANTERI-MINET, M.; ISNARDON, P.; DE POMMERY, J.; MENETREY, D. Spinal and hindbrain structures involved in viscerception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins. **Neuroscience**, 55: 737-53, 1993.
- LEE, Y; LEE, CH; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**, 20: 315-24, 2005.
- LEITE, L. C. C., FURTADO, M. F. D., CORREA, T. C., RAW, I. Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102, p. 515-520, 1992.

- LEVINE J. D.; REICHLING D. B. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain.**; Suppl 6:S103-9, 1999.
- LIEBET, A.D.; BICKNELL, B.T.; ADAMS, R.D. Protein conformational modulation by photons: A mechanism for laser treatment effects. **Medical Hypotheses** 82: 275–281, 2014.
- LIVAK, K. J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. **Genet Anal.** 4(5–6):143–9, 1999.
- LOWRENCE, J.; STORMANP, W.; BASCARAMURTY, S.; JORDAN, L. M.; MALISZA, K.L. Correlation of functional activation in the rat spinal cord with neuronal activation detected by immunohistochemistry. **Neuroimage.** 22:1802-1807, 2004.
- LUMB, B.M. Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for Adelta- and C-nociceptors. **Exp Physiol.** 87(2):281-6, 2002.
- LYONS, C. R. The role of nitric oxide in inflammation advances. **Immunology**, v. 60, p. 323-371, 1995.
- MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; TRAUB, R.J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**, 60:367–74, 1994.
- MELLO, J. B., MELLO, G. P. S. **Laser em Odontologia**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed. Santo, p. 174, 2001.
- MERKE, H.; BOGDUK, N. Definitions. **IASP-International Association for the Study of Pain IASP Pain Terminology**, 2003.
- MESTER, E., MESTER, A. F., MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.** v. 5, p. 31-39, 1985.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** 57(1):1-164, 1999.
- MILLIGAN, E. D.; TWINING, C.; CHACUR, M.; BIEDENKAPP, J.; O'CONNOR, K.; POOLE, S.; TRACEY, K.; MARTIN, D.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **Journal of Neuroscience**, 23: 1026-1040, 2003.
- MINETA, Y; EISENBERG, E; STRASSMAN, AM. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal medullary reticular formation following noxious facial stimulation in the rat. **Exp Brain Res.**, v. 107, p. 34-38, 1995.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. p.131, 1999.
- MOREIRA, V.; TEIXEIRA, C.; BORGES DA SILVA, H.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; DOS-SANTOS, M. C. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by Bothrops atrox venom. **Toxicon**. 2013 Jun 1;67:37-46.

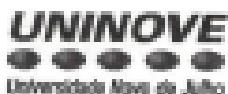
- MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Role of ion flux in the control of c-Fos expression. **Nature**, 322: 5552-555, 1986.
- NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A. B.; CARLOS, F. P.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Med. Sci.** DOI 10.1007/s10103-011-0914-1. 2011.
- NISHIOKA, S.A.; SILVEIRA, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lace headed viper bite in Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.47, p.805-810, 1992.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **J. Herp.** v.37, p. 653-659, 2003.
- NUÑEZ, V., OTERO, R., BARONA, J., SALDARRIAGA, M., OSORIO, R.G., FONNEGRA, R., JIME'NEZ, S.L., DIAZ, A., QUINTANA, J.C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 37, 969–977. 2004.
- OLIVEIRA, R. G.; FERREIRA, A. P.; CÔRTES, A. J.; AARESTRUP, B. J.; ANDRADE, L. C.; AARESTRUP, F. M. Low-level laser reduces the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 induced by OVA. **Lasers Med Sci** v.28(6):1519-25, 2013.
- OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C., PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 213-216, 2005.
- OLIVO, R.A., TEIXEIRA, C.F.P., WALLACE, J.L., GUTIERREZ, J.M., ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in edema-forming activity of *bothropic* venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 670-677, 2007.
- PALLOTTA, R.C.; BJORDAL, J.M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E.C.P.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R.L.; RAMOS, L.; MESSIAS, F.M.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med. Sci.** 27, 71-78, 2012.
- PEREA, G. & ARAQUE, A. Communication between astrocytes and neurons: language. **J. Physiol Paris**, 96: 199-207, 2002.
- PEREIRA, I. C.; BARBOSA, A M.; SALVADOR, M. J.; SOARES, A. M.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Anti-inflammatory activity of Blutaparon portulacoides ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BTHTX-I and II. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.** V.15, n.3, p.527-545, 2009.
- PEREIRA, D. M.; COGO, J. C. ; ZAMUNER, S. R. . Efeito antiedematogênico da planta *Vernonia scorpioides* frente ao veneno de *Bothrops fonscawai* e carragenina. **ConScientiae Saúde** (Impresso), v. 11, p. 10-14, 2012.
- PERTOVAARA, A.; BRAVO, R.; HERDEGEN, T. Induction and suppression of immediate-early genes in the rat brain by a selective alpha-2-adrenoceptor agonist

- and antagonist following noxious peripheral stimulation. **Neuroscience**. 54: 117-26, 1993.
- RIEDEL, W; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, 60: 404-15, 2001.
  - RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochemie**. 83, p. 471-489, 2001.
  - ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (eds). Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates. **Academic Press**, New York, London. Volume II. p. 346-381, 1971.
  - ROSTELATO-FERREIRA, S. L. G. B.; CINTRA, A. C. O.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Heparin at low concentration acts as antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. **J Venom Res**. v.15;1, p.54-60, 2010.
  - SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.** 8, 1677–1690, 2004.
  - STELLA, N.; TENCE, M.; GLOWINSKI, J.; PREMONT, J. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. **J. Neurosci**, 14: 568-75, 1994.
  - TAKASAKI, I.; ANDOH, T; SHIRAKI, K; KURAISHI, Y. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **Pain**, v. 86, p. 95–101, 2000.
  - TASCIYOLU, F.; ARMAGAN, O.; TABAK, Y.; CORAPCI, I.; ONER, C. Low power laser treatment in patients with knee osteoarthritis. **Swiss Med WKLY**, v.134, p.254-258, 2004.
  - TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, 32 (4): 419-426, 1994.
  - TREBIEN, H.A. & CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw o edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, 26: 292-300, 1989.
  - TUNER, J., HODE, L. Low level laser therapy: **Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 2002.
  - VANE, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. **Nature New Biol**. v. 31, p. 34-69, 1971.
  - VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemi**. v.69, p.81-90, 2004.
  - XAVIER, M.; DE SOUZA, R. A.; PIRES, V. A.; SANTOS, A. P.; AIMBIRE, F.; SILVA, J. A. JR, ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A. B. Low-level light-emitting

diode therapy increases mRNA expressions of IL-10 and type I and III collagens on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Med Sci.** 2014.

- WATKINS, L. R; MAIER, S. F. **Nat Rev Drug Discov.** 2(12):973-85, 2003.
- WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci.** 24: 450-5, 2001.
- WU, J. Y.; CHEN, C. H.; WANG, C. Z.; HO, M. L.; YEH, M. L.; WANG, Y. H. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMPlevel and NF-κB activity. **PLoS One.** v 8(1):e54067.
- ZAMUNER, S. R. ; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n.3, p. 259-272, 2004.
- ZAMUNER S. R, GUTIÉRREZ JM, MUSCARÁ MN, TEIXEIRA SA, TEIXEIRA C.F.*Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, Oct;39 (10):1505-13, 2001.
- ZAMUNER, S. R., TEIXEIRA, C.F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.** 11(6): 351-7, 2002.
- ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA JUNIOR, A.; GONÇALVES, R. B. Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Descontaminação Bacteriana. **Rev APCD.**, v. 56, p.7-11, 2002.
- ZIMMERMANN, M. **Pain**, 16(2): 109-10, 1983.
- ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M., TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated form *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335-346, 2005.

## VII – ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA – UNINOVE  
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Prédio C – Térreo  
ceua@uninove.br

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0021/2011

**Título do Projeto: ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA E DO LED NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA LOCAL INDUZIDA PELO VENENO DE *Buthrops mojanai***

Orientador: Stella Regina Zamuner

Aluno: Níkole Nadir Andrade

**Objetivos:** Avaliar o mecanismo de ação antiinflamatória do laser de baixa potência e do LED na reação inflamatória local causada pelo veneno de *Buthrops mojanai*.

Os objetivos estão claros e de acordo com as legislações nacionais, recomendações da Sociedade de Animais de Laboratório e recomendações internacionais.

**Método:**

Serão realizados experimentos com o intuito de caracterizar os mecanismos envolvidos no efeito antiinflamatório do laser de baixa potência e do LED nos efeitos pró - inflamatórios causados pelo veneno de *B. mojanai*, quanto a liberação do mediador TNF- $\alpha$ , liberação de IL-6 e IL-1 e a produção de PGE<sub>2</sub> e a expressão proteica de COX-2 e iNOS e sua inibição pelo laser ou LED. Para a avaliação desses estudos o veneno será injetado no peritônio dos animais, em doses efetivas previamente avaliadas. Nos sobrenadantes dos líquidos de lavagem, nos obtidos diferentes grupos experimentais (injetados com o veneno ou toxinas e controles e nos diferentes intervalos de tempo), serão determinados a concentração de PGE<sub>2</sub> por ensaio imunoenzimático específico. Ainda, serão coletados os leucócitos para a determinação da expressão proteica de COX-2 e iNOS. Em todos os protocolos experimentais, o laser de baixa potência e o LED será aplicado 30 minutos e 3 horas após a inflamação induzida pelo veneno ou toxinas.

Os métodos e procedimentos estão claros e de acordo com as legislações nacionais, recomendações da Sociedade de Animais de Laboratório e recomendações internacionais.

**Animais (procedência, ração, linhagem, número de animais, peso, sexo):**  
Serão utilizados 100 camundongos/Swiss machos, pesando entre 22-25 g.  
Está de acordo.

**Condições de alojamento e nutrição:**

Inicialmente os animais serão pré-tratados com antiparásitários e mantidos com água e alimentação ad libitum, mantidos em sala com temperatura e umidade constante (24°C – 60%), com ciclo clare/escuro (12/12 horas).

As condições de alojamento e nutrição estão claras e de acordo com as legislações nacionais, recomendações da Sociedade de Animais de Laboratório e recomendações internacionais.

**Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:**  
Não se aplica.

*Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):*  
Não se aplica.

*Eutanásia:*

Os animais serão sacrificados em atmosfera de CO<sub>2</sub>.

O procedimento de eutanásia está claro e de acordo com as legislações nacionais, recomendações da Sociedade de Animais de Laboratório e recomendações internacionais.

*Pertinência e valor científico do estudo proposto:*

Essa pesquisa poderá favorecer dados adicionais para uma eventual aplicação da fotobioestimulação como terapia coadjuvante a soroterapia. Além disso, esse estudo poderá permitir a melhor compreensão das ações de venenos Botrópicos na inflamação local do ponto de vista de seus mecanismos de ação.

A pertinência e valor científico estão claros.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

( ) Não-Aprovado

São Paulo, 24 de agosto de 2011.



Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajac  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da  
Universidade Nove de Julho