

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GISELE DIAS DA SILVA

**FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NO TRATAMENTO
DAS LESÕES MUSCULARES CAUSADAS PELA PEÇONHA
DA SERPENTE *Bothrops leucurus***

Ilhéus - Bahia

2022

GISELE DIAS DA SILVA

**FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NO TRATAMENTO DAS
LESÕES MUSCULARES CAUSADAS PELA PEÇONHA DA
SERPENTE *Bothrops leucurus***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e sanidade animal

Subárea: Patologia Animal

Orientadora: Fabiana Lessa Silva

Ilhéus – Bahia

2022

S586

Silva, Gisele Dias da.

Fotobiomodulação a laser no tratamento das lesões musculares causada pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus* / Gisele Dias da Silva. – Ilhéus, BA: UESC, 2022.

90f. : il.

Orientadora: Fabiana Lessa Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências e apêndices.

1. Fototerapia. 2. Lasers. 3. Músculos esqueléticos. 4. *Bothrops*. I. Título.

CDD 615.831

GISELE DIAS DA SILVA

**FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NO TRATAMENTO DAS LESÕES
MUSCULARES CAUSADAS PELA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops leucurus***

Ilhéus – Bahia 18/02/2022

Dra. Fabiana Lessa Silva
UESC/DCAA
(Orientadora)

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB

Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes-Martins
UB/PPG

ILHÉUS – BAHIA

2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que me foram concedidas até aqui e por sempre se fazer presente em minha vida.

Aos meus pais, Zilda Dias da Silva e Ronaldo Barreto da Silva, meus maiores exemplos de amor, determinação, honestidade, respeito ao próximo e persistência. Sou grata a eles por toda paciência e por acreditarem nos meus sonhos e participarem ativamente da minha caminhada, sempre me dando apoio, força e estímulo para continuar.

Ao meu irmão Ronaldo Júnior, minha grande inspiração. Sua companhia, atenção, carinho, cuidado e amor tornam minha vida muito mais simples e leve, por isso, agradeço.

A minha avó Anoyna pelo amor especial que me dá, por se alegrar com minhas conquistas e torcer pelo meu sucesso sempre.

Às Joias (Kau, Bill, Jay e Lêco), minhas melhores amigas e grandes mulheres com quem sempre posso sorrir, chorar, falar besteira, discutir assuntos sérios... Enfim “conto com elas pra tudo”. Agradeço especialmente a Kauanne que, além de aguentar morar comigo, foi membro oficial da equipe nessa etapa da minha vida (teve que lutar e não foi pouco), muito obrigada por tanto, princesa.

Aos meus orientadores, Fabiana Lessa Silva e Fernando Alzamora Filho, pelo estímulo ao meu crescimento, incentivo, apoio, paciência e entusiasmo. A dedicação de vocês e o exemplo pessoal e profissional que são significam muito para mim. Muito obrigada por caminharem comigo até aqui.

À equipe Pocket (Nerildo, Danilo e Flávia) que desde o início das atividades abraçaram esse trabalho, deram o seu melhor e espalharam alegria e leveza à minha volta. Vocês fizeram a diferença e me alegro imensamente tê-los por perto. Agradeço também aos colegas Adriana e Bruno que me apoiaram e ajudaram com dedicação e afinco, a participação de vocês foi muito importante para mim, muito obrigada por aceitarem tão gentilmente participar dessa etapa comigo.

Aos colegas de turma Bruno, Luane, Jamille, Katharine, Andressa, Thalita... Com quem dividi momentos de aflição e “pequenas alegrias da vida adulta”. A Bia que é muito atenciosa e me salva sempre que possível, obrigada pelo companheirismo e paciência.

À professora Helena pela parceria e pela atenção, disposição e carinho demonstrados.

À professora Anaiá pela paciência, dedicação, cuidado e por todas as contribuições feitas.

Ao biotério Labio (UESC) e ao professor Juneo pela disponibilidade dos animais e do espaço e recursos para desenvolvimento das atividades experimentais do meu trabalho.

A Ivo e Seu Zé pela ajuda no laboratório e no biotério sempre com tranquilidade e boa vontade.

A Gabi e Izabela pela disponibilidade, paciência, cuidado e persistência durante as análises enzimáticas e a Jeane pela ajuda e contribuição com sua experiência, conselhos, dicas e carinho.

A todos os professores que participaram da minha formação e contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Ecco Fibras pelo financiamento do dispositivo laser utilizado no desenvolvimento do experimento.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelos recursos e apoio.

À CAPES pelo concedimento da bolsa de estudos.

A todos que participaram e contribuíram para o desenvolvimento dessa etapa da minha vida de forma direta ou indireta, muito obrigada!

FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NO TRATAMENTO DAS LESÕES MUSCULARES CAUSADAS PELA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops leucurus*

RESUMO

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos notificados no Brasil e na região Nordeste *B. leucurus* é a espécie predominante. A fotobimodulação a laser tem sido considerada uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento das lesões locais decorrentes de acidentes botrópicos, todavia, ainda não há registro dos efeitos da associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho nesse contexto. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, isoladamente e em associação, no tratamento das lesões musculares ocasionadas pela peçonha da serpente *B. leucurus*. Para isso, foram utilizados 112 camundongos machos, os quais receberam 50 µl da peçonha de *B. leucurus* diluída (0,6 mg/kg) no músculo gastrocnêmio direito e 50 µl de solução salina no músculo contralateral. Os animais foram divididos em quatro grupos, cada um com 28 animais, sendo um controle (GC) e três grupos tratados, a saber: 1) laser vermelho ($\lambda=660$ nm) (GV), 2) laser infravermelho ($\lambda=808$ nm) (GI) e 3) laser vermelho ($\lambda=660$ nm) + infravermelho ($\lambda=808$ nm) (GVI). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos de sete animais de acordo com o tempo de tratamento: 24, 48,72 e 144 horas. Foi realizada a avaliação clínica dos animais antes da eutanásia. Parte das amostras musculares foi submetida ao processamento histológico e corada pelo método de Hematoxilina-eosina e *Picrosirius red* para avaliação da intensidade inflamatória, hemorragia, tipo de infiltrado inflamatório e deposição de colágeno. Os demais fragmentos foram submetidos à mensuração do nível de creatina kinase (CK) e amostras de sangue foram utilizadas para avaliação da concentração sérica de CK e aspartato aminotransferase (AST). Para os dados considerados paramétricos foi realizado o teste ANOVA seguido do teste t de Student (_post hoc_). Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-whitney (_post hoc_). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e incluída a correção de Bonferroni para os testes _post hoc_. Para avaliação das variáveis qualitativas aplicou-se o teste qui-quadrado considerado significativo quando $p < 0,05$. A aplicação dos lasers vermelho e infravermelho reduziu significativamente a atividade edematogênica, intensidade inflamatória, hemorragia, as alterações clínicas e as concentrações enzimáticas séricas em relação ao controle, enquanto o uso associado dos lasers apresentou um melhor efeito quando comparado ao laser vermelho e infravermelho utilizados isoladamente. O comprimento de onda vermelho aumentou significativamente a deposição de colágeno, assim como os comprimentos de onda vermelho e infravermelho associados, que diferiram significativamente do infravermelho. Destaca-se que, quando comparada à utilização dos comprimentos de onda isoladamente, a associação da luz laser vermelha e infravermelha provocou efeitos mais expressivos em relação a maioria das variáveis estudadas.

Palavras-chave: comprimentos de onda; luz laser; musculo esquelético; peçonha botrópica.

PHOTOBIMODULATION IN THE TREATMENT OF MUSCLE INJURIES CAUSED BY SNAKE VENOM *Bothrops leucurus*

ABSTRACT

Snakes of the genus *Bothrops* are responsible for most snakebites reported in Brazil and in the Northeast, *B leucurus* is the predominant species. Laser photobiomodulation has been considered a promising therapeutic modality in relation to the treatment of local lesions resulting from bothropic accidents, however, there is still no record the effects of the association between red and infrared wavelengths in this context. For this, 112 male mice were used, which received 50 μ l of *B. leucurus* venom diluted (0.6 mg/kg) in the right gastrocnemius muscle and 50 μ l of saline solution in the contralateral muscle. The animals were divided into four groups, each with 28 animals, one control (CG) and three treated groups, namely: 1) red laser ($\lambda=660$ nm) (GV), 2) infrared laser ($\lambda=808$ nm) (GI) and 3) red laser ($\lambda=660$ nm) + infrared ($\lambda=808$ nm) (GVI). Each group was subdivided into four subgroups of seven animals according to treatment time: 24, 48, 72 and 144 hours. Clinical evaluation of the animals was performed before euthanasia. Part of the muscle samples was submitted to histological processing and stained using the Hematoxylin-eosin and *Picrosirius red* method to assess inflammatory intensity, hemorrhage, type of inflammatory infiltrate and collagen deposition. The other fragments were submitted to measurement of the level of creatine kinase (CK) and blood samples were used to evaluate the serum concentration of CK and aspartate aminotransferase (AST). For data considered parametric, the ANOVA test was performed followed by Student's t test (_post hoc_). For variables that did not show normal distribution, the Kruskal-Wallis test was performed followed by the Mann-whitney test (_post hoc_). Differences were considered significant when $p < 0.05$ and Bonferroni correction was included for the _post hoc_ tests. To evaluate the qualitative variables, the chi-square test was applied, considered significant when $p < 0.05$. The application of red and infrared lasers significantly reduced edematogenic activity, inflammatory intensity, hemorrhage, clinical changes and serum enzyme concentrations in relation to the control, while the associated use of lasers showed a better effect when compared to red and infrared laser used alone. The red wavelength significantly increased collagen deposition, as did the associated red and infrared wavelengths, which differed significantly from the infrared. It is noteworthy that, when compared to the use of wavelengths alone, the association of red and infrared laser light caused more expressive effects in relation to most of the variables studied.

Keywords: bothropic venom; laser light; skeletal muscle; wavelengths.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Resumo das atividades experimentais desenvolvidas. 1. A peçonha bruta de serpentes *Bothrops leucurus* foi diluída em solução salina a 0,9%. 2. Foram inoculados 50 µl de peçonha no músculo gastrocnêmio direito e o mesmo volume de solução salina no músculo contralateral. 3. O laser foi aplicado com DE de 10J/cm² em todos os animais independente do comprimento de onda utilizado (técnica pontual). 4. A avaliação clínica de todos os animais foi feita a cada 24 horas. 5. A eutanásia foi realizada por meio de aprofundamento anestésico. 6. Os músculos gastrocnêmios esquerdo e direito foram coletados para averiguação da atividade edematogênica e enzimática muscular e o sangue para análise enzimática sérica.....37

Figura 2: Avaliação do reflexo de propriocepção. A- Animal do GC 24 horas após a inoculação da peçonha com reflexo de propriocepção ausente (seta). B- Animal do GVI (Grupo vermelho + infra) com reflexo de propriocepção presente 24 horas após a aplicação da peçonha.....38

Figura 3- Músculos gastrocnêmios de animais submetidos aos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Músculo gastrocnêmio direito aumentado de tamanho em relação ao contralateral e de coloração intensamente avermelhada (24 horas). Alterações menos intensas nos subgrupos avaliados 48, 72 e 144 horas após a inoculação da peçonha.....40

Figura 4 - Atividade edematogênica - Comparações entre grupos: A: Vermelho x controle (U = 67,00), infra x controle (U = 39,00), vermelho + infra x controle (U = 11), vermelho + infra x vermelho (U = 132), infra x vermelho + infra (U = 99). *** p<0,001. B: Atividade edematogênica - Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC): Não houve diferença significativa. C: Atividade edematogênica- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas (W = 36 e p = 0,013). ** p<0,01. D: Atividade edematogênica- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas (W = 34 e p = 0,026). * p<0,05. E: Atividade edematogênica - Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com os comprimentos vermelho + infra (GVI): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas (W = 36 e p = 0,013).....42

Figura 5 - Níveis séricos de CK: Comparação entre os grupos experimentais. A: Vermelho x controle (t = 6,382 e p <0,001), infra x controle (t = 5,476 e p <0,001), vermelho + infra x controle (t = 10,790 e p <0,001), infra x vermelho + infra (t = 5,163 e p <0,001), vermelho x vermelho + infra (t = 4,556 e p <0,001). B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 144 horas (t = 3,486 e p = 0,013) e 48 x 144 (t = 3,060 e p = 0,036). * p<0,05. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença os tempos de 24 x 144 horas (t = 3,435 e p = 0,014). * p<0,05. D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Houve diferença os tempos de 24 x 144 horas (t = 3,491 e p = 0,014). * p<0,05. E: Níveis séricos de CK- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença entre os tempos 24 x 48 horas

($t = 5,123$ e $p < 0,001$), 24 x 72 ($t = 6,822$ e $p < 0,001$) e 24 x 144 ($t = 6,187$ e $p < 0,001$).....43

Figura 6 - Níveis séricos de AST: Comparações entre os diferentes grupos experimentais.

A: Vermelho x controle ($U = 101,00$ e $p < 0,001$), infra x controle ($U = 101,00$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x controle ($U = 15$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x vermelho ($U = 165$ e $p = 0,007$), infra x vermelho + infra ($U = 131$ e $p < 0,001$). B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 144 ($W = 40,5$ e $p = 0,039$). C: Comparações entre os diferentes de tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença os tempos de 48 x 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$). D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Não diferença significativa entre os tempos de avaliação. E: Comparações entre os diferentes de tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença entre os tempos E-24 x 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$).....45

Figura 7 - Níveis musculares de CK. A: Vermelho x controle ($U = 131,00$ e $p < 0,001$), infra x controle ($U = 123,00$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x controle ($U = 78,5$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x vermelho ($U = 199$ e $p = 0,003$), infra x vermelho + infra ($U = 169$ e $p < 0,001$).

B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,019$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,01$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,012$), 48 x 144 ($W = 1,00$ e $p = 0,025$). C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,013$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,013$). D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,012$). E: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,007$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,013$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,013$).....46

CAPÍTULO II

Figura 8 - Resumo das atividades experimentais desenvolvidas.

1. A peçonha bruta da serpente *B. leucuruus* foi diluída em solução salina a 0,9%. 2. Foram inoculados 50 µl de peçonha no músculo gastrocnêmio direito (0,6 mg/kg). 3. Aplicação do laser (técnica pontual) com DE de 10J/cm² em todos os animais independente do comprimento de onda utilizado. 4. Realização da eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. 6. Coleta dos músculos gastrocnêmios para análise histomorfométrica.....58

Figura 9 - Lesões histopatológicas observadas nos diferentes grupos nos tempos de 24 e 144 horas.

Fragments de músculo gastrocnêmio submetidos à inoculação da peçonha de *B. leucurus* corados em H.E (40x). A -B: Não tratados. C-D: Tratados com laser vermelho (660 nm). E-F: Tratados com laser infravermelho (808 nm). G-H: Tratados com laser vermelho + Infravermelho. Seta branca: Áreas de hemorragia. Seta preta: Células inflamatórias. X: Fibras musculares necróticas.....59

Figura 10 - Intensidade da inflamação.

A: Comparações entre os diferentes grupos experimentais: GV x GC ($U = 14,00$ e $p < 0,001$), GI x GC ($U = 14,00$ e $p < 0,001$), GVI x GC ($U = 0,00$ e $p < 0,001$), GVI x GV ($U = 159$ e $p = 0,0492$), GI x GVI ($U = 109$ e $p = 0,0157$). A:

Diferença entre todos os grupos tratados e o controle). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Sem diferença significativa. (ns) não significativo. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Diferença significativa entre os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Diferença entre os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) $p < 0,05$. E: entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho e infra (GVI). Diferença entre todos os tempos de tratamento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$63

Figura 11 – Deposição de colágeno ao longo do tempo. Fragmentos de músculo gastrocnêmio submetidos à inoculação da peçonha de *B. leucurus* corados em *Picrosirius red* (20x). A: Todos os grupos no tempo de 24 horas. B: Todos os grupos no tempo de 48 horas. C: Todos os grupos no tempo de 72 horas. D: Todos os grupos no tempo de 144 horas. RGB color: Imagem original. RGB *stack*: escala de cinza.....65

Figura 12 - Deposição de colágeno: Comparações entre os diferentes grupos experimentais. A: Vermelho x controle ($U = 207,00$ e $p = 0,004$), vermelho + infra x controle ($U = 125$ e $p < 0,001$), infra x vermelho + infra ($U = 199$ e $p = 0,007$). (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, (ns) não significativo. B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas. (*) $p < 0,05$. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Diferença significativa entre todos os tempos de tratamento, exceto entre 72 e 144 horas (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. E: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Diferença significativa entre todos os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (ns) não significativo.....66

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela1 - Características dos estudos sobre a fotobiomodulação no tratamento de lesões ocasionadas pela peçonha botrópica realizados no período de 2003 a 2021.....	31
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 2- Protocolo terapêutico aplicado nos diferentes grupos de tratamento.....	38
Tabela 3 - Alterações clínicas observadas nos diferentes grupos experimentais.....	42

CAPÍTULO II

Tabela 4- Protocolo terapêutico aplicado nos diferentes grupos de tratamento	63
Tabela 5- Intensidade da inflamação: Comparação entre os diferentes tempos de tratamento.....	67
Tabela 6 – Tipo de infiltrado inflamatório predominante nos diferentes grupos experimentais.....	68
Tabela 7 – Tipo de infiltrado inflamatório predominante nos diferentes tempos de tratamento.....	69
Tabela 8 – Intensidade da hemorragia nos diferentes grupos experimentais.....	72
Tabela 9 – Intensidade da hemorragia nos diferentes tempos de tratamento.....	73
Tabela 10- Deposição de colágeno: Comparação entre os diferentes tempos de tratament.....	78

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL - Microlitros

ANOVA – Análise de variância

AST – Aspartato aminotransferase

CCL2 – Quimiocina (C-C Motif) ligante 2

CCL5 - Quimiocina (C-C Motif) ligante 5

CK – Creatina kinase

DE – Densidade energética

IL-1 – Interleucina 1

IL-18 – Interleucina 18

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

J - Joules

ml - Mililitros

Myf5 – Fator miogênico 5

NLRP3 - Receptor do tipo NOD com domínio pirina 3

Pax7 – Proteína de caixa emparelhada 7

PLA₂ – Fosfolipase A2

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO GERAL	19
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 Acidentes ofídicos no Brasil	20
4.2 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	22
4.3 Fisiopatologia das lesões ocasionadas pela peçonha botrópica	23
4.4 Reparo muscular	27
4.5 Fotobiomodulação no tratamento de lesões locais ocasionadas por serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	30
5. CAPÍTULO I: Efeitos clínicos da associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho no tratamento de lesões locais ocasionadas pela peçonha da serpente <i>Bothrops leucurus</i>	35
5.1 Introdução	36
5.2 Material e métodos	36
5.2.1 Protocolo experimental.....	36
5.2.2 Avaliação clínica.....	38
5.2.3 Coleta de amostras.....	38
5.2.4 Atividade edematogênica.....	39
5.2.5 Análises enzimáticas.....	39
5.2.6 Análise estatística.....	39
5.3 Resultados	40
5.4 Discussão	55
5.5 Conclusão	59
6. CAPÍTULO II: A associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho reduz a inflamação e aumenta a deposição de colágeno em lesões ocasionadas pela peçonha da serpente <i>Bothrops leucurus</i>	60
6.1 Introdução	61
6.2 Material e métodos	61
6.2.1 Protocolo experimental.....	61

6.2.2 Coleta de amostras.....	63
6.2.3 Análise histomorfométrica.....	63
6.2.4 Análise estatística.....	64
6.3 Resultados.....	65
6.4 Discussão.....	77
6.5 Conclusão.....	81
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
Apêndice I.....	86
Apêndice II.....	88
Apêndice III.....	90

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* compõem o grupo de animais peçonhentos mais importante do ponto de vista epidemiológico (MAMEDE et al., 2020). No ano de 2021, foram notificados 176.857 acidentes ofídicos no país, dos quais 86,01% dos animais identificados pertenciam ao gênero *Bothrops* (DATASUS, 2022). Vale salientar que a serpente *Bothrops leucurus* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos notificados no Nordeste brasileiro (LAURIA et al., 2021), sendo a Bahia o estado com terceiro maior índice de acidentes botrópicos registrados no país (NASCIMENTO et al., 2017). Nessas situações, as principais lesões locais observadas são hemorragia, necrose e inflamação. A insuficiência renal aguda em função de nefrose hemoglobinúrica e/ou mioglobinúrica constitui a consequência sistêmica mais frequente (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Embora no Brasil os acidentes ofídicos que envolvem animais domésticos não sejam classificados como agravos de notificação obrigatória, tais eventos também se mostram importantes e, nesse contexto, o gênero *Bothrops* também se destaca, sendo as lesões observadas muito semelhantes às descritas em seres humanos. Os animais de produção são acometidos mais frequentemente e os bovinos são os que mais sofrem com acidentes botrópicos (HERRERA et al., 2016). Os equinos (MACHADO et al., 2019) e ovinos (TOKARNIA et al., 2008) são menos frequentemente afetados. Além disso, também existem registros de acidentes ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops* em cães (LIMA et al., 2019). Porém, a ausência de dados oficiais dificulta a compreensão do impacto epidemiológico desses agravos na medicina veterinária, principalmente quando se trata de animais de companhia.

Quanto ao tratamento das lesões causadas por serpentes do gênero *Bothrops*, a soroterapia é a intervenção mais indicada e reduz significativamente o índice de óbitos decorrentes desses acidentes. Porém, seus efeitos locais não são expressivos, o que evidencia a importância da busca por terapias alternativas que possam ser a ela associadas (FAN et al., 2018; ALANGODE et al., 2020). Nesse contexto, a fotobiomodulação a laser quando utilizada no tratamento de lesões musculares ocasionadas por serpentes do gênero *Bothrops* tem demonstrado efetiva atividade anti-inflamatória, analgésica e anti-edematogênica, além de acelerar o reparo tecidual (SILVA et al., 2018). Esses efeitos são comuns às lesões causadas especificamente pela serpente *B. leucurus* quando tratadas com o laser vermelho e com o infravermelho (LAURIA et al., 2021).

Apesar disso, os trabalhos desenvolvidos até o momento avaliaram os efeitos individuais do laser vermelho e do infravermelho e a maioria deles foi realizada em períodos curtos (BARBOSA et al., 2009; NADUR-ANDRADE et al., 2016; DOURADO et al., 2017; LAURIA et al., 2021), de modo que ainda não são conhecidos os efeitos dos comprimentos de onda vermelho (visível) e infravermelho (invisível) associados no tratamento de lesões ocasionadas pela serpente *B. leucurus*. A combinação dos comprimentos de onda em questão no tratamento de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente demonstrou melhores resultados em relação ao uso individual do laser vermelho e do infravermelho (LIMA et al., 2014). Todavia, a escassez de estudos referentes ao uso da fotobiomodulação a laser no tratamento de outros tecidos e por períodos mais prolongados de aplicação dificulta o estabelecimento de protocolos terapêuticos confiáveis.

Diante disso, a hipótese do presente estudo é que os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho associados sobre as lesões ocasionadas pela serpente *B. leucurus* são melhores quando comparados aos efeitos desses comprimentos empregados individualmente.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação no tratamento das lesões musculares ocasionadas pela peçonha de serpentes *B. leucurus* em camundongos

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar isoladamente os efeitos do laser vermelho (660 nm), do laser infravermelho (808 nm) e da associação do laser vermelho e infravermelho sobre o tratamento da necrose tecidual causada pela peçonha botrópica;
- Comparar a resposta inflamatória, atividade edematogênica, enzimática muscular e sérica e a deposição de colágeno obtidos por meio de diferentes tempos de exposição à luz laser;
- Descrever e comparar, por meio da histologia, o processo de reparo tecidual em cada um dos grupos experimentais;
- Avaliar os efeitos clínicos dos protocolos terapêuticos aplicados aos grupos experimentais.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Acidentes ofídicos no Brasil

Acidentes ocasionados por animais peçonhentos estão associados a índices expressivos de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente em regiões de clima tropical (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Tal agravo foi adicionado à lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) no ano de 2009 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), à Lista de Notificação Compulsória (LNC) do Brasil, de acordo com a portaria nº 2.472 de 31 de agosto de 2010, e mantido na lista de DTNs no documento “*Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030*”, mediante o qual o Brasil e outros países se comprometeram com a OMS em reduzir a letalidade causada por acidentes ofídicos em 50% até o ano de 2030 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Dentre os diversos animais peçonhentos que podem ocasionar disfunções fisiológicas em seres humanos, as serpentes são consideradas as mais importantes do ponto de vista epidemiológico (SOUZA et al., 2018). De acordo com a OMS (2017), é registrada uma média mundial de acidentes ofídicos por ano que varia entre 4,5 e 5,4 milhões, dos quais de 81.000 a 130.000 culminam em óbito. No Brasil, Matos e Ignotti (2020) apontaram uma média anual de 27.511 acidentes ofídicos e destes, 86,8% foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 8,9% pelo gênero *Crotalus*, 3,5% pelo gênero *Lachesis* e 0,8% pelo gênero *Micrurus*. Vale salientar que, desde o início das notificações desses agravos no Brasil, o gênero *Bothrops* se destaca em relação à quantidade de acidentes ocorridos, o que está relacionado com a predominância desses animais no território nacional em relação aos indivíduos pertencentes aos demais gêneros citados (VAZ et al., 2020).

O Brasil se destaca na América do Sul em número de acidentes ofídicos notificados (RORIZ et al., 2018). De acordo com os dados registrados até o presente momento, o Nordeste foi a região com o segundo maior índice de acidentes ofídicos no Brasil em 2021 e a Bahia é o primeiro estado dessa região e o terceiro do país, sendo que o gênero *Bothrops* se destaca em todas as situações descritas (DATASUS, 2021). Embora a região Norte não esteja entre as três regiões com maiores índices de acidentes ofídicos, foi a primeira região em acidentes botrópicos do país em 2021 (DATASUS, 2021). Além disso, Matos e Ignotti (2020) demonstraram maiores taxas de prevalência e incidência de acidentes botrópicos na Amazônia visto que, embora as espécies pertencentes a esse gênero se adaptem bem aos variados biomas que compõem o território nacional, as condições amazônicas são as que mais se aproximam do ideal para o desenvolvimento e reprodução de algumas espécies como a *B. atrox*, que é encontrada predominantemente nessa região.

Além dos aspectos associados especificamente à saúde pública, os acidentes ofídicos e suas consequências podem refletir problemas socioeconômicos e ambientais enfrentados no Brasil. A alta incidência desses agravos na região amazônica, por exemplo, cursa com o aumento progressivo das taxas de desmatamento, o que acontece inclusive em terras de preservação obrigatória (GUTIÉRREZ et al., 2017; RORIZ et al., 2018). Além disso, grande parte das vítimas de acidentes ofídicos no Brasil é habitante da zona rural e de terras indígenas, localidades em que, geralmente, o acesso aos serviços de saúde é difícil, o que pode influenciar o prognóstico dos casos, visto que o tempo decorrido entre a inoculação da peçonha e o início da conduta terapêutica é determinante para a resolução das lesões sistêmicas e locais (MISE et al., 2018; KASTURINATNE et al., 2021).

Desde sua descoberta, a soroterapia aumentou significativamente a taxa de sobrevivência associada a esses agravos no Brasil e, por isso, se tornou a intervenção terapêutica preconizada no país em casos de acidentes ofídicos (BOCHNER et al., 2003). Até o ano de 2017, o Brasil produzia uma quantidade de soro antiofídico suficiente para mediar 100% dos acidentes ocorridos por ano e o maior desafio era sua distribuição uniforme pelo território nacional (CUNHA, 2017). Porém, atualmente a capacidade de produção dos laboratórios públicos nacionais está reduzida como consequência das políticas governamentais do país, ao passo que o valor disponível para aquisição governamental do soro antiofídico também foi reduzido o que, a médio e longo prazo, pode comprometer os avanços epidemiológicos já alcançados (FAN et al., 2019; SCHENEIDER et al., 2021).

Ainda que a soroterapia seja utilizada com sucesso no tratamento de vítimas de acidentes ofídicos no nosso país, aproximadamente 14% dos pacientes considerados curados têm pelo menos uma complicação de saúde a longo prazo (JAYAWARDANA et al., 2018). Dentre as sequelas crônicas descritas, as alterações musculoesqueléticas são as mais frequentes e variam de amputações parciais ou totais (menos frequentes) a edema recorrente, fibrose extensa com comprometimento da movimentação, perda muscular, mialgia intermitente e rigidez articular, com persistência de 13,4 anos em média (WAIDDYANATHA et al., 2019). Diante disso, o tratamento das lesões locais associadas aos acidentes ofídicos ainda se caracteriza como um desafio no Brasil e em outros países e motiva o desenvolvimento de estudos referentes a utilização de diversas técnicas terapêuticas integrativas na tentativa de reduzir os danos teciduais ocasionados pela ação direta da peçonha sobre os tecidos (NADUR-ANDRADE et al., 2016).

4.2 Serpentes do gênero *Bothrops*

O Brasil é conhecido por sua riqueza e variedade de características ambientais que viabilizam a manutenção de uma fauna ampla e diversificada, a exemplo das 412 espécies de serpentes identificadas no território nacional (NOGUEIRA et al., 2019). Destas, apenas aquelas pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae são peçonhentas e a segunda abrange os gêneros *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* (BERNARDE, 2009). Existem aproximadamente 45 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* distribuídas desde o México até a Argentina e 26 delas são encontradas no Brasil (BISNETO & KAEFER, 2019). As espécies mais importantes epidemiologicamente são a *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. insularis*, *B. atrox* e *B. leucurus* (BERNARDE, 2014).

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam tamanhos variados de acordo com a espécie, medindo de 30 cm (*B. itapetinigae*) a 2,20 m (*B. jararacussu*) (BERNARDE, 2014) de comprimento e a maioria das espécies apresenta atividade predominantemente noturna, com hábitos terrícolas, arborícolas ou semi-arborícolas (ALVES et al., 2000). A alimentação desses animais é consideravelmente diversificada e a dieta, embora sempre carnívora, abrange minhocas, moluscos, insetos, peixes, anuros, lagartos, outras serpentes, pássaros, ovos e roedores (BERNARDE & ABE, 2010). As glândulas produtoras de peçonha anexadas ao aparelho inoculador têm por função principal a captura e digestão das presas. Entretanto, em situações ameaçadoras, essas serpentes utilizam a peçonha como ferramenta de defesa, o que resulta nos acidentes ofídicos envolvendo humanos e animais domésticos (BERNARDE, 2014).

Bothrops leucurus é a espécie botrópica predominante na faixa da Mata atlântica que abarca o Nordeste e se distribui desde o Ceará até o Espírito Santo e é a responsável pela maior parte dos acidentes ofídicos registrados em todos os locais em que predomina (LIRA-DASILVA et al., 2009). Esses animais medem em média 1,20 m e podem chegar a 1,50 m de comprimento (BERNARDE, 2014), apresentam hábitos noturnos, são terrícolas e, eventualmente, sobem em troncos de árvores em busca de alimento ou em situações de perigo. Se alimentam essencialmente de lagartos e anuros quando jovens e de roedores na vida adulta (ARGÔLO, 2004). Ademais, embora sejam encontradas com maior frequência em áreas florestais preservadas, também ocorrem em faixas urbanas, o que tende a se tornar mais comum com o avançar do desmatamento e fragmentação da Mata Atlântica (SAMPAIO et al., 2018).

A peçonha da serpente *B. leucurus* é composta por uma variedade de constituintes com predominância de proteínas, peptídeos e aminas bioativas que, em associação, provocam as alterações locais e sistêmicas nas vítimas dos acidentes ocasionados por essa espécie (BELLO

et al., 2006; MAIA-MARQUES et al., 2021). Embora a peçonha de *B. leucurus* seja composta também por desintegrinas, lectinas do tipo C e L-aminoácidos oxidases (HIGUCHI et al., 2011; ARANDA-SOUZA et al., 2014; MORAIS et al., 2015), estudos proteômicos e genômicos demonstraram que as fosfolipases A₂, serino-proteases e metaloproteases são os constituintes com maior potencial lesivo e são as principais responsáveis pela manifestação das atividades tóxicas ocasionadas pela peçonha dessa serpente (GUTIÉRREZ et al., 2017; GREN et al., 2019).

As alterações ocasionadas por *B. leucurus* são variadas e as lesões locais mais comuns são hemorragia local, necrose muscular e edema. Além disso, os danos mais severos podem resultar em sequelas locais e sistêmicas importantes, como insuficiência renal, distúrbios circulatórios e insuficiência hepática (WAIDDYANATHA et al., 2019; LAURIA et al., 2021). A peçonha de *B. leucurus* pode também ter efeito cardiotoxico e levar a hipotensão sistêmica aguda, disfunção considerada determinante nos casos que evoluem para o óbito (OLIVEIRA et al., 2003; MENEZES et al., 2020). Ademais, recentemente comprovou-se que o desenvolvimento ontogenético dos animais da espécie *B. leucurus* promove alterações biológicas na peçonha, assim como o sexo dos indivíduos interfere na atividade tóxica da peçonha, o que implica na necessidade de produção de soros antiofídicos espécie-específicos a partir da peçonha de animais em diferentes fases do desenvolvimento e de ambos os sexos (BRAGA et al., 2020).

4.3 Fisiopatologia das lesões ocasionadas pela peçonha botrópica

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* é inoculada pela via intramuscular e, uma vez no organismo, parte das toxinas atua no local e nos tecidos adjacentes, ao passo que outra parte é distribuída por meio dos vasos sanguíneos e sistema linfático, o que resulta nos efeitos sistêmicos associados aos acidentes botrópicos (GUTIÉRREZ et al., 2017). A gravidade das lesões pode ser influenciada pelo sexo e idade da serpente, de modo que machos produzem peçonha com maior atividade miotóxica e hemorrágica. Apesar de os efeitos da peçonha dos adultos serem considerados mais expressivos, os acidentes provocados por animais jovens não devem ser subestimados, visto que produzem peçonha com maior atividade coagulante quando comparada à de animais mais velhos (FURTADO et al., 2006; BRAGA et al., 2020). Além disso, algumas características inerentes à vítima também são consideradas determinantes como a idade (>61 anos), a distância entre o local do acidente e a unidade de saúde e a dose do soro

antiofídico administrada que são considerados fatores de risco de letalidade associados a acidentes botrópicos no Brasil (SOUZA et al., 2018).

Como citado anteriormente, as fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem uns dos mais importantes princípios ativos da peçonha das serpentes do gênero *Bothrops*. Elas correspondem a aproximadamente 30% da massa bruta da peçonha de animais adultos e, devido à sua alta capacidade de induzir necrose muscular aguda, são também chamadas de miotoxinas (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 2011). A peçonha botrópica é composta por dois tipos de fosfolipases A₂: a PLA₂ Asp49, que possui um resíduo de aspartato na posição 49, o que lhe confere atividade enzimática; e a PLA₂ Lys49, seu homólogo inativo, que apresenta uma lisina ou outros aminoácidos na posição 49, que bloqueiam o sítio de ligação do cálcio (Ca²⁺) e impedem a catálise. Por esse motivo, a fosfolipase PLA₂ Lys49 não atua como uma enzima (ANGULO & LOMONTE, 2009; MORA-OBANDO, 2014).

Apesar da diferença estrutural descrita, é sabido que ambas PLA₂ desempenham atividades miotóxicas orquestradas pela ruptura da membrana sarcoplasmática, com consequente elevação do influxo de íons Ca²⁺ nos miócitos, o que resulta em perda de função mitocondrial, proteólise generalizada, hipercontração das miofibrilas e degeneração das células musculares (CINTRA et al., 2009). Além disso, promovem redução da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e da concentração de íons potássio (K⁺) extracelular e, por consequência, aumentam a extensão da área lesada e provocam prolongamento da dor (CINTRA et al., 2010). Ademais, as duas fosfolipases são capazes de induzir necrose muscular e não são identificadas diferenças histológicas e ultraestruturais entre os tecidos submetidos às ações das diferentes PLA₂ (LOMONTE & RANGEL, 2012). Diante disso, é sugerido que embora a PLA₂ Asp49 e a Lys49 sejam capazes de perturbar a estabilidade da membrana plasmática e gerar os danos já citados, a segunda desintegra a membrana plasmática por meio de mecanismos independentes de hidrólise (FERNÁNDEZ et al., 2013).

Uma vez compreendidas as atividades celulares que medeiam os danos teciduais provocados pelas fosfolipases, chama-se atenção para os eventos patológicos observados em decorrência de sua ação, dentre os quais se destacam a necrose muscular, inflamação, edema, distúrbios hemorrágicos e dor (SOARES et al., 2004). Quando se trata de mionecrose, entende-se que a morte celular está diretamente associada à ruptura da membrana celular que implica na impossibilidade de reversão da lesão (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 2011). Vale salientar que o reparo tecidual nessas situações é demorado, o que pode estar associado, entre outros fatores, à capacidade das PLA₂ de induzir danos ao DNA das células sobre as quais atuam, o

que retarda a síntese de novos constituintes celulares (MARCUSI et al., 2013). A hemorragia descrita também está ligada à ação das fosfolipases sobre as membranas das células endoteliais, embora essa fração da peçonha não seja considerada a mais expressiva em relação aos efeitos hemorrágicos (BERLING & ISBISTER, 2015).

A inflamação também é estimulada pelas PLA₂ que levam à liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , resultando na intensificação da migração e adesão leucocitária (MARANGONI et al., 2013), e de quimiocinas como CCL2, CCL5 e CXCL8 que recrutam células inflamatórias e contribuem com a associação entre efeitos trombóticos e inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2019). Em adição, a atuação das PLA₂ está associada ao aumento dos níveis teciduais de mastócitos degranulados e neutrófilos, além do acréscimo do nível sérico de bradicinina, serotonina e histamina nas primeiras horas após a inoculação da peçonha (DELAFOTAINÉ et al., 2017). Outros eventos moleculares inflamatórios foram descritos recentemente como parte dos efeitos das PLA₂, a exemplo do estímulo à extrusão de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), que pode contribuir com o controle de infecções bacterianas secundárias à picada de serpentes do gênero *Bothrops* (SETÚBAL et al., 2020) e da ativação do inflamassoma pela via NLRP3, que resulta na maturação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 (BOENO et al., 2020).

Quanto ao edema, além do processo inflamatório que acompanha a necrose tecidual e dos danos ocasionados aos vasos sanguíneos, tal evento é influenciado pela ação das fosfolipases sobre o músculo liso dos vasos linfáticos, que compromete a dinâmica dos fluidos no tecido, além de influenciar a biodistribuição sistêmica da peçonha (MORA et al., 2008). A dor, por sua vez, é explicada pela estimulação direta dos nociceptores no momento da inoculação da peçonha, a liberação de histamina pelos mastócitos desencadeada pelas PLA₂ e o aumento da liberação de íons K⁺ que desestabiliza o potencial de membrana e leva a estímulos hiperexcitatórios e incoordenados. Além disso, ocorre a degeneração das membranas do terminal nervoso motor e danos neurológicos periféricos, por vezes irreversíveis (FEIN, 2014; HARRIS & SCOTT-DAVEY, 2013).

As metaloproteases da peçonha de serpentes (SVMP) também são componentes tóxicos estudados com frequência para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desencadeamento das lesões causadas por serpentes do gênero *Bothrops* (ROCHA & FURTADO, 2005). As SVMPs, também chamadas de hemorraginas, são as principais responsáveis pela atividade hemorrágica da peçonha botrópica e atuam diretamente sobre os componentes da membrana basal dos vasos sanguíneos e outros tecidos e da matriz extracelular

circundante, que são as estruturas que, de forma mais eficiente, conferem estabilidade aos capilares (ESCALANTE et al., 2011). Em adição, as hemorraginas participam dos eventos hemodinâmicos por meio da ativação direta da protrombina e do fator X da cascata de coagulação, além de degradarem o fibrinogênio e o fator de *Von Willebrand*, o que impede a agregação plaquetária (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; PALACIO et al., 2017). Os eventos supracitados culminam, em grande parte dos acidentes botrópicos, com coagulopatias caracterizadas pela depleção dos fatores de coagulação, incoagulabilidade sanguínea e trombocitopenia (BERLING & ISBISTER, 2015), além dos efeitos das metaloproteases sobre as células endoteliais que resultam em hemorragia local e sistêmica e podem evoluir para choque hipovolêmico (WELLMANN et al., 2020). Quanto ao reparo das lesões ocasionadas por serpentes do gênero *Bothrops*, acredita-se que as SVMPs estejam expressivamente associadas ao tempo prolongado de recuperação, o que se associa à destruição da membrana basal da microvasculatura, nervos e músculos e o conseqüente impedimento da distribuição adequada de oxigênio, nutrientes e estímulos nervosos (HERNÁNDEZ et al., 2011).

As serino-proteases presentes na peçonha botrópica são enzimas com função semelhante às metaloproteases em relação à ativação direta da protrombina, de modo que o tipo de protrombina ativada difere, mas seus efeitos convergem para o desenvolvimento das coagulopatias anteriormente descritas (KINI, 2005; CUNHA & MARTINS, 2012). Além disso, quando ativadas, essas enzimas liberam bradicinina e contribuem para a vasodilatação observada como consequência da ação da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, o que pode provocar hipovolemia, hipotensão, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático local e sistêmico (GUTIÉRREZ et al., 2017; D' AMÉLIO et al., 2021).

Além das lesões anteriormente contextualizadas, são descritos distúrbios em sistemas específicos como consequência de acidentes botrópicos, a exemplo de alterações cardiovasculares e renais (JAYAWARDANA et al., 2018). Nessa perspectiva, sabe-se que a peçonha botrópica bruta, assim como as PLA₂ isoladas, pode induzir, de forma direta, bradicardia, hipotensão e arritmia com disfunção da condução elétrica atrial (EVANGELISTA et al., 2010). Quanto aos rins, estudos demonstraram que a peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* tem potencial nefrotóxico tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*, de modo que seus efeitos são expressos por meio da redução da pressão de perfusão e da resistência vascular renal (JORGE et al, 2017), o que se aplica também à *B. leucurus* especificamente (MORAIS et al., 2013). Ademais, são descritas necrose tubular e cortical externa, glomerulonefrite e vasculite

como alterações associadas a insuficiência renal aguda em decorrência do acúmulo de mioglobina e hemoglobina nos rins (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Considerando as principais lesões ocasionadas pela peçonha botrópica e suas consequências locais e sistêmicas e a possibilidade de enfrentamento de sequelas a longo prazo que podem comprometer a qualidade de vida das vítimas dos acidentes (WAIDDYANATHA et al., 2019), sugere-se que a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em tais eventos pode direcionar a escolha da conduta terapêutica a ser adotada no tratamento dessas injúrias e influenciar o prognóstico dos casos.

4.4 Reparo muscular

A recuperação dos músculos esqueléticos é um processo adaptativo complexo que pode envolver eventos regenerativos e cicatriciais, o que resulta no reestabelecimento morfofuncional do tecido de forma parcial ou total (BAGHDADI & TAJBAKSH, 2018). Tais atividades são mediadas por diversos constituintes teciduais, a exemplo das células satélites, células musculares que se mantêm íntegras após a lesão e matriz extracelular, de modo que, o sucesso do reparo está associado à quantidade e integridade desses componentes e à interação entre eles após o insulto (CHEN & SHAN, 2019).

Os músculos esqueléticos, em sua maioria, possuem capacidade tônica ou postural e são responsáveis pela movimentação do complexo músculo-tendão-osso por meio de suas contrações. Desse modo, alterações morfofuncionais musculares culminam com frequência em disfunções locomotoras consideráveis (FLORES et al., 2018). A lesão muscular se inicia mediante o estabelecimento de um insulto (agudo ou crônico). A partir de então, observa-se ruptura e necrose das fibras musculares seguida do influxo de células inflamatórias (principalmente neutrófilos e monócitos) que, em associação com a matriz extracelular, plaquetas e miócitos íntegros, estimulam a liberação de alguns mediadores inflamatórios como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2), interleucinas, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e óxido nítrico. Na sequência são desencadeadas as fases de reparo, associada à remoção dos restos celulares, formação de tecidos conectivos, angiogênese e formação de novas estruturas nervosas. Logo após ocorre a remodelação, caracterizada pela maturação das miofibrilas regeneradas, reorganização do tecido cicatricial (quando presente) e reestabelecimento funcional do tecido (FERNANDES et al., 2011).

O reparo tecidual envolve a proliferação de diversos tipos celulares que atuam em conjunto no reestabelecimento das características morfofuncionais do tecido, a exemplo das células íntegras remanescentes e células do endotélio vascular, as quais participam da angiogênese e contribuem para a manutenção dos níveis adequados de nutrientes e oxigênio durante a resolução da lesão. Os fibroblastos por sua vez compõem o tecido conjuntivo fibroso que ocupa as áreas que não podem ser regeneradas adequadamente. A capacidade proliferativa intrínseca de cada tecido e a presença de células-tronco são fatores que influenciam o reparo, de maneira que o músculo esquelético, embora classificado como tecido permanente, possui uma habilidade regenerativa considerável devido à presença das células satélites associadas à bainha do endomísio (ABBAS et al., 2020).

As células satélites são as principais células-tronco envolvidas no reparo muscular em indivíduos adultos e sua importância está associada à expressão de fatores de transcrição miogênicos, principalmente Pax7 e Myf5, que são produzidos por essas células e sua progênie no tecido muscular em condições fisiológicas (YIN et al., 2013). Uma vez estabelecida a lesão, essas células são ativadas e se inicia o processo de expansão e diferenciação. Em seguida, parte delas se funde com as fibras musculares íntegras presentes no tecido e com outras células satélites e outra parte sustenta o estímulo à expressão de Pax7 e Myf5 para a produção de novas células-tronco a serem armazenadas para necessidades futuras (JUBAN & CHAZAUD, 2018). É válido destacar que essas células interagem com outros tipos celulares como neutrófilos, macrófagos e, principalmente, células endoteliais que também estimulam a expansão e diferenciação celulares, além de serem determinantes para a formação de novos vasos sanguíneos no local, o que contribui para a eficiência funcional das novas fibras musculares (ABOU-KHALIL et al., 2009).

Para que o reparo muscular ocorra de forma satisfatória, é imprescindível que a homeostase perturbada pelo insulto lesivo seja reestabelecida, uma vez que as lesões musculares estão frequentemente associadas a alterações da integridade da membrana sarcoplasmática, o que culmina com a incapacidade de regulação celular do fluxo de micro e macromoléculas. O cálcio é um importante desencadeador do desequilíbrio celular nessas situações, de forma que o aumento do influxo deste íon favorece a ativação de proteases, a exemplo das PLA₂, que intensificam os danos à membrana (FREDSTED et al., 2007). Ademais, o aumento da atividade dessas enzimas no tecido leva à liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que reagem com os componentes da membrana sarcoplasmática e também

contribuem para intensificação da lesão (LE MOAL et al., 2017). Destaca-se que os mecanismos em questão, apesar de potencializarem os danos à membrana, podem atuar como sinalizadores e desencadear respostas vinculadas ao reparo muscular (TIDBALL, 2011).

As mitocôndrias são também organelas importantes para o reparo muscular uma vez que controla os níveis citosólicos de cálcio dependente do canal mitocondrial uniporter de cálcio (MCU), que capta íons Ca^{2+} e favorece sua rápida eliminação (LE MOAL et al., 2017). Além disso, o aumento da concentração de cálcio intramitocondrial altera o funcionamento da cadeia respiratória e leva à elevação da produção de ROS e acelera o processo de polimerização da actina e torna mais eficiente a remodelação das miofibras. Outro aspecto relevante é a associação entre o tempo de contato das ROS com o tecido muscular uma vez que, embora os efeitos crônicos da alteração do potencial redox celular sejam lesivos, em casos de elevações agudas essas moléculas podem acelerar o reparo e aumentar a força mecânica das células regeneradas (HORN et al., 2017).

Além disso, o reestabelecimento das características morfofuncionais das células musculares também é orquestrado por moléculas como lipídios da membrana, proteínas e microRNA (miRNA) carregados por exossomos e citocinas autócrinas que estimulam a ativação e diferenciação celular, a comunicação célula-célula e o processo de fusão que culminam com a reconstituição dos miotubos (DEMONBREUN et al., 2015). A membrana plasmática das células musculares tem configuração semelhante à das demais células, sendo sua bicamada lipídica composta por fosfolipídios, cuja organização está vinculada ao estado da célula. Desse modo, a ruptura das miofibras implica em mudanças na orientação dessas estruturas que migram da região interna da membrana para a externa e atuam como sinalizadoras no processo de quimiotaxia de macrófagos para remoção dos componentes teciduais danificados (FADEEL & XUE, 2009).

Destaca-se que a compreensão dos mecanismos envolvidos no reparo muscular é indispensável para a escolha de estratégias que visam a aceleração e aprimoramento desse processo. Embora existam muitas possibilidades terapêuticas disponíveis para a mediação de distúrbios musculoesqueléticos a curto e longo prazo, as lesões musculares, com frequência, provocam perdas teciduais consideráveis e complicações relacionadas à extensão da área cicatricial e reestabelecimento ineficiente das funções neuromotoras do tecido (LIU et al., 2018).

4.5 Fotobiomodulação no tratamento de lesões locais ocasionadas por serpentes do gênero *Bothrops*

O uso de fotobiomodulação no manejo das mais variadas situações clínicas tem se tornado cada vez mais comum nos últimos tempos de maneira que, devido à sua monocromaticidade e coerência, a interação entre a luz laser e o tecido é expressiva tanto quando utilizada como terapia principal, quanto em associação com outros métodos (ROLA et al., 2014). De modo geral, os benefícios da laserterapia no tratamento de lesões do sistema locomotor estão associados à analgesia, angiogênese e ao aumento da proliferação fibroblástica, da síntese de colágeno e da atividade das células fagocíticas, que aceleram o reparo tecidual (SOUZA & SILVA, 2016). Um dos principais efeitos da fotobiomodulação é o reestabelecimento da capacidade de produção de ATP, o que resulta na elevação da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, aumento do potencial redox da célula e aceleração do metabolismo celular (GLASS, 2020).

Quando empregada no tratamento de lesões musculares ocasionadas por serpentes do gênero *Bothrops*, a fotobiomodulação demonstra efetiva atividade anti-inflamatória, analgésica, anti-edematogênica e acelera o reparo tecidual (SILVA et al., 2018), o que se aplica às alterações causadas especificamente pelas serpentes *B. moojeni* (DOURADO et al., 2003), *B. jararacussu* (BARBOSA et al., 2010), *B. neuwiedi* (DOURADO et al., 2008), *B. jararaca* (GIARETTA et al., 2016) e *B. leucurus* (LAURIA et al., 2021). Além disso, Riegel e Godbold (2017) afirmam que, na Medicina Veterinária, o tratamento de vítimas de acidentes ofídicos com laserterapia resulta em ótimos resultados, principalmente em relação à redução do edema local e da intensidade inflamatória, aumento da neovascularização e regeneração de fibras musculares.

Quanto aos comprimentos de onda, tanto o laser vermelho quanto o infravermelho próximo resultam em efeitos satisfatórios em relação às lesões de interesse nos principais estudos desenvolvidos com acidentes botrópicos até o momento. A Tabela 1 evidencia os comprimentos de onda, a espécie de serpente, a densidade energética utilizada e o tempo de tratamento abordados nesses trabalhos:

Tabela1 - Características dos estudos sobre a fotobiomodulação no tratamento de lesões ocasionadas pela peçonha botrópica realizados no período de 2003 a 2021

Autor/Ano	Animal	Comprimento de onda	Densidade energética (J/cm²)	Espécie de serpente	Tempos de avaliação
DOURADO et al., 2003	Camundongo	Infra	4	<i>B. moojeni</i>	3, 12 e 24 horas
DOURADO et al., 2008	Rato	Vermelho	4,2	<i>B. neuwiedi</i>	3 e 24 horas, 3 e 7 dias
BARBOSA et al., 2008	Camundongo	Vermelho	4,2	<i>B. jararacussu</i>	3 e 24 horas
BARBOSA et al., 2009	Camundongo	Vermelho	3,5	<i>B. jararacussu</i>	3 e 24 horas
DOIN-SILVA et al., 2009	Rato	Vermelho	3,5	<i>B. jararacussu</i>	3 horas
BARBOSA et al., 2010	Camundongo	Vermelho	10,5	<i>B. jararacussu</i>	3 e 24 horas
DOURADO et al., 2011	Camundongo	Vermelho	4,2	<i>B. moojeni</i>	3 e 12 horas, 3, 7 e 14 dias
NADUR-ANDRADE et al., 2012	Camundongo	Vermelho x Infra	4	<i>B. jararacussu</i>	24 horas
ARANHA-DE SOUZA et al., 2013	Camundongo	Vermelho	4	<i>B. moojeni</i>	72 horas
NADUR-ANDRADE et al., 2014	Camundongo	Vermelho	2,2	<i>B. moojeni</i>	6 horas
SILVA et al., 2016	Camundongo	Vermelho x Infra	7	<i>B. jararacussu</i>	15, 30 e 60 minutos
NADUR-ANDRADE et al., 2016	Camundongo	Vermelho	2,2	<i>B. moojeni</i>	1, 3, 6 e 24 horas
VIEIRA et al., 2016	Camundongo	Infra	4	<i>B. moojeni</i>	24, 48 e 72 horas
FRANCO et al., 2016	Camundongo	Vermelho x Infra	4 e 5	<i>B. jararaca</i>	30, 60 e 120 minutos
GOUVEIA et al., 2020	Camundongo	Vermelho	4,4	<i>B. moojeni</i>	2 horas
LAURIA et al., 2021	Camundongo	Vermelho x Infra	4,8 e 4,2	<i>B. leucurus</i>	24 horas
VIEIRA et al., 2021	Camundongo	Infra	4	<i>B. jararacussu</i>	24, 48 e 72 horas
FERNANDES et al., 2021	Camundongo	Vermelho	4	<i>B. jararacussu</i>	3 e 24 horas

Adaptado de SILVA et al., 2018.

Diante disso, nota-se que a maior parte das pesquisas desenvolvidas nessa área baseou-se nos efeitos do laser vermelho e que algumas compararam os efeitos de ambos os comprimentos de onda. Adicionalmente, o tempo de tratamento avaliado variou entre 15 minutos e 7 dias, embora a maioria tenha sido desenvolvida em períodos de no máximo 72 horas. Ademais, a densidade energética média aplicada foi de 5,8 J/cm² independente da espécie de serpente estudada e os camundongos foram os animais experimentais utilizados com maior frequência.

Dourado et al. (2003) publicaram o primeiro estudo referente à utilização da fotobiomodulação no tratamento de lesões musculares ocasionadas pela peçonha botrópica, demonstrando os efeitos do comprimento de onda infravermelho (904 nm) em relação às alterações histopatológicas e ao nível sérico da enzima Creatina Kinase (CK) em camundongos. Os resultados obtidos evidenciaram que o laser invisível reduziu significativamente a hemorragia, congestão, edema e a quantidade de leucócitos no local da lesão, além de diminuir a concentração de CK no sangue dos animais tratados em detrimento dos indivíduos controle, o que indica que a luz laser desempenhou atividade citoprotetora nessa situação e reduziu a capacidade da peçonha de induzir a ruptura do sarcolema das fibras musculares.

O primeiro trabalho que demonstrou os efeitos do laser vermelho (660 nm) no tratamento de lesões causadas por serpentes do gênero *Bothrops* foi publicado por Dourado et al. (2008). O estudo demonstrou a efetividade da fotobiomodulação com comprimento de onda visível no tratamento da hemorragia, inflamação e mionecrose causadas pela serpente *B. neuwiedi*. Tais achados foram associados à afinidade do laser vermelho com a citocromo C-oxidase, o que pode explicar a potencialização da atividade metabólica celular nessa situação. Ademais, Barbosa et al. (2009) demonstraram que, 24 horas após a inoculação da peçonha seguida da aplicação do laser vermelho (685 nm), houve redução de 85% da capacidade da peçonha da serpente *B. jararacussu* de induzir mionecrose, sendo esse o tempo mínimo necessário para a observação desses efeitos no estudo em questão.

O comprimento de onda visível (632,8 nm) foi testado por Doin-Silva et al. (2009) em diferentes protocolos no tratamento das alterações locais causadas pela peçonha da serpente *B. jararacussu*. A partir desse estudo os autores sugeriram que o melhor protocolo seria três aplicações do laser com densidade energética de 3,5 J/cm², que resultou na redução da área da lesão em 64%, reduziu o bloqueio neuromuscular em 62% e os níveis de CK em 54%. Barbosa et al. (2008) estudaram ainda os efeitos do laser vermelho (685 nm) sobre a ação das miotoxinas isoladas da peçonha da serpente *B. jararacussu* e evidenciaram a redução do edema em 53%,

do influxo de leucócitos em 57,6% e da mionecrose em 60% como efeito do tratamento durante 24 horas (quatro aplicações). Ambos os trabalhos sugeriram a utilização do laser vermelho como alternativa no tratamento de lesões musculares associadas à peçonha botrópica.

Em adição, foram comparados os efeitos do laser infravermelho (945 nm) e da luz LED, associados ou não à soroterapia, sobre o edema causado pelas miotoxinas MjTX-I e MjTX-II extraídas da peçonha da serpente *B moojeni* (NADUR-ANDRADE et al., 2014). Os autores constataram que a luz LED e o laser infravermelho reduziram significativamente a atividade edematogênica. No entanto, não houve diferença entre os tipos de luz utilizados e a soroterapia não interferiu nos efeitos locais da fotobiomodulação. Diante disso, foi sugerido que os efeitos locais da peçonha botrópica podem ser reduzidos por meio da fotobioestimulação associada à terapia sistêmica. Foi avaliada também a participação do laser vermelho (685 nm) na modulação da nocicepção e da liberação de citocinas após a inoculação da peçonha de *B moojeni* (NADUR-ANDRADE et al., 2016). O estudo apontou que a fotobiomodulação interfere no processo nocicepção à medida que inibe a hiperalgesia causada pela peçonha, além de reduzir a expressão de receptores de IL-6, TNF- α (citocinas pró-inflamatórias), o que implica em seu papel anti-inflamatório.

Mais recentemente, Lauria et al. (2021) realizaram um estudo com o objetivo de comparar os efeitos dos comprimentos vermelho (660 nm) e infravermelho (780 nm) quanto às variáveis limiar nociceptivo, edema local, hemorragia e nível sérico de CK em camundongos inoculados com a peçonha da serpente *B. leucurus*. Os resultados alcançados sugerem que, de forma independente do comprimento de onda, a fotobiomodulação reduz a hipernocicepção, o edema local e os níveis séricos de CK e não altera a hemorragia causadas pela peçonha botrópica. Além disso, os efeitos do comprimento vermelho foram observados mais precocemente quando comparados aos do laser infravermelho.

Num outro estudo, Vieira et al. (2021) utilizaram o laser infravermelho (904 nm) no tratamento experimental de lesões locais ocasionadas pela peçonha da serpente *B. jararacuçu* e os resultados obtidos indicaram que o tratamento foi capaz de estimular as células satélite e intensificar a diferenciação miogênica, além de reduzir a área de necrose e a quantidade de células inflamatórias no local da lesão.

Além da realização de experimentos *in vivo*, Vieira et al. (2016) desenvolveram um estudo *in vitro* para comparação entre os comprimentos de onda vermelho (685 nm) e infravermelho (830 nm) quanto à citoproteção e estímulo à diferenciação dos mioblastos. O trabalho apontou que tanto o laser vermelho quanto o infravermelho desempenharam atividade

citoprotetora e estimularam a diferenciação de mioblastos em miotubos, não havendo diferença entre os comprimentos de onda sobre essas respostas. Os autores demonstraram que a fotobiomodulação também aumentou a concentração de ATP intracelular e que esse pode ser um dos mecanismos envolvidos na mediação da citoproteção supracitada.

Franco et al. (2016) estudaram os efeitos *in vitro* dos comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (780 nm) sobre a integridade de células endoteliais submetidas à ação da peçonha da serpente *B. jararaca*. Nesse estudo, os tratamentos não diferiram entre si e aumentaram a viabilidade celular além de reduzir a liberação de lactato desidrogenase (LDH) e IL-1 β , o que implica na atividade citoprotetora da fotobiomodulação, direcionada especificamente às células endoteliais. Gouveia et al. (2020) avaliaram ainda os efeitos *in vitro* do laser vermelho (660 nm) sobre células mioblásticas submetidas aos efeitos da peçonha das serpentes *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. jararaca*. Os resultados obtidos por esses autores sugerem que o comprimento visível reduz a morte celular por apoptose e necrose e a liberação de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6), o que caracteriza sua ação como citoprotetora e moduladora dos processos de inflamação e morte celular, independente da espécie de serpente.

É válido salientar que a utilização da soroterapia é indispensável no manejo das alterações sistêmicas causadas pela peçonha botrópica, o que implica no uso da fotobiomodulação associada à terapia sistêmica preconizada. Além disso, chama-se atenção para o fato de que não são encontrados com frequência relatos de caso de acidentes ofídicos em que a fotobiomodulação tenha sido empregada no tratamento das alterações locais, o que indica que, apesar da comprovação científica de seus efeitos, na conduta prática ainda há muito espaço a ser conquistado pela luz laser.

5 CAPÍTULO I

Efeitos clínicos da associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho no tratamento de lesões locais ocasionadas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus*

Resumo

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil e a espécie *Bothrops leucurus* predomina no Nordeste do país. A soroterapia é eficaz na neutralização das alterações sistêmicas causadas pela peçonha botrópica, porém seus efeitos locais não são expressivos. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos comprimentos de onda visível e invisível, individualmente e em associação, sobre a atividade edematogênica local, enzimática sérica e muscular e resposta clínica de camundongos submetidos à inoculação da peçonha da serpente *B. leucurus*. Foram utilizados 112 camundongos machos. Em todos os animais a peçonha foi inoculada no músculo gastrocnêmio direito e o mesmo volume de solução salina foi aplicado no músculo contralateral. Os animais foram divididos em quatro grupos, cada um com 28 animais, sendo um controle e três grupos tratados: 1) laser vermelho ($\lambda=660$ nm), 2) laser infravermelho ($\lambda=808$ nm) e 3) laser vermelho ($\lambda=660$ nm) + infravermelho ($\lambda=808$ nm). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos, de acordo com a duração de aplicação do tratamento. Foi utilizado o laser diodo (0,1 W, CW, 1J/ponto, DE: 10 J/cm²), aplicado com intervalos de 24 horas sendo o mesmo intervalo de tempo utilizado para realização das avaliações clínicas. A eutanásia foi realizada 24 horas após a última sessão de tratamento em cada subgrupo, seguida de coleta dos músculos gastrocnêmios e sangue para subsequente avaliação da atividade edematogênica e enzimática. Os tratamentos com laser vermelho e infravermelho reduziram a claudicação, preveniram a perda do reflexo de propriocepção e aceleraram seu reestabelecimento, reduziram a hemorragia local e atenuaram a redução da movimentação ocasionada pela inoculação da peçonha botrópica, enquanto a associação dos tratamentos apresentou melhores resultados quando comparado aos tratamentos isolados. Ambos os comprimentos de onda reduziram as concentrações séricas de Creatina Kinase (CK) e Aspartato aminotransferase (AST) e aumentaram a concentração muscular de CK, enquanto melhores resultados foram observados no tratamento em associação. A luz laser reduziu significativamente a atividade edematogênica provocada pela peçonha botrópica em relação ao grupo não tratado, com redução mais significativa na associação dos lasers. Sendo assim, o tratamento reduziu todas as variáveis avaliadas em relação ao grupo não tratado e a redução mais significativa foi observada como efeito dos comprimentos de onda associados.

Palavras-chave: fotobiomodulação; músculo esquelético; *Bothrops sp.*

5.1 Introdução

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 86,8% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no território nacional (MATOS e IGNOTTI, 2020) e a espécie *Bothrops leucurus* predomina no Nordeste do país, sendo a Bahia o estado dessa região com o maior número de notificações associadas à essa espécie (BRAGA et al., 2020). Uma vez inoculada, a peçonha botrópica induz lesões locais agudas que, frequentemente, culminam com a amputação ou perturbações funcionais do membro afetado (MAMEDE et al., 2020). Os membros inferiores são atingidos em cerca de 75,2% dos acidentes botrópicos, o que se associa com o hábito terrícola ou semi-arborícola da maioria das serpentes do gênero (MISE et al., 2007).

Dentre as alterações clínicas mais relevantes nesses casos, destaca-se a dor que, além de muito comum, está associada à redução da movimentação da região afetada, claudicação e às mudanças comportamentais observadas nas vítimas de acidentes ofídicos (CAVALCANTE et al., 2021). Ademais, o aumento da atividade edematogênica nos tecidos lesionados e a mionecrose também são respostas teciduais recorrentes e sua modulação é considerada determinante para o estabelecimento do prognóstico dos quadros clínicos nesses casos (MAMEDE et al., 2020).

Embora a soroterapia seja capaz de neutralizar os efeitos sistêmicos nessas situações, sua ação não é expressiva em relação ao tecido alvo de inoculação da peçonha (MISE et al., 2018). Sendo assim, a fotobiomodulação é considerada uma modalidade terapêutica potencialmente eficaz no tratamento das lesões musculares desencadeadas pela peçonha botrópica (SILVA et al., 2018). Todavia, ainda não há estudos avaliando o uso associado dos comprimentos de onda vermelho (visível) e infravermelho (invisível) no tratamento local da lesão causada pela peçonha botrópica. Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos comprimentos de onda visível e invisível, individualmente e em associação, sobre a atividade edematogênica, enzimática e resposta clínica de camundongos submetidos à inoculação da peçonha da serpente *B. leucurus* no músculo gastrocnêmio.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Protocolo experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UESC (protocolo No 026/20).

Foram utilizados 112 camundongos machos com peso entre 25 e 30 gramas, oriundos do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (sete animais cada) com comida e água *ad libitum*, sob temperatura controlada de aproximadamente 23°C e ciclos de luz alternados (12 horas de luz, 12 horas de escuro).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos (28 animais cada) de acordo com o comprimento de onda utilizado no tratamento, a saber: vermelho (GV), infravermelho (GI), vermelho + infravermelho (GVI) e controle (GC). Além disso, cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos (sete animais cada) de acordo com os diferentes tempos de tratamento: 24, 48, 72 e 144 horas. Desse modo, os componentes dos subgrupos tratados por 24 horas receberam uma aplicação do laser, os tratados por 48 horas receberam duas aplicações, os tratados por 72 horas receberam três aplicações e os tratados por 144 horas receberam um total de seis aplicações de laser.

Foi utilizada a peçonha bruta liofilizada de *B. leucurus*, cuja massa foi aferida em uma balança analítica e o produto foi diluído em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% estéril, de acordo com Fernandes et al. (2020). A pele da região onde se localiza o músculo gastrocnêmio foi submetida à tricotomia e higienização com Clorexidina degermante, seguida da aplicação intramuscular da peçonha diluída na dose de 0,6 mg/kg no músculo do lado direito. No músculo gastrocnêmio contralateral foi injetado o mesmo volume de solução salina estéril para posterior avaliação da atividade edematogênica e seu acompanhamento após a aplicação do laser (BARBOSA et al., 2010; FERNANDES et al., 2020). Todos os animais receberam o mesmo volume de peçonha e de solução salina (50 µl).

Em todos os animais o laser foi aplicado 30 minutos após a inoculação da peçonha. O dispositivo utilizado no experimento foi o laser diodo com potência de 100 mW, emissão contínua (CW), spot de 0,1cm², comprimento de onda de 660 nm (vermelho) e 808 nm (infravermelho). Todos os grupos receberam a mesma densidade energética (Tabela 2). A contenção dos animais foi realizada manualmente durante a aplicação do laser e a luz foi direcionada à área do músculo gastrocnêmio onde a peçonha foi inoculada. A técnica de aplicação foi padronizada para todos os grupos com exceção do controle (utilização do laser desligado) (BARBOSA et al., 2010). As doses foram aplicadas com intervalos de 24 horas em todos os grupos que receberam mais de uma aplicação ao longo do tratamento com a finalidade de padronizar as etapas do protocolo utilizado.

Os animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após a última aplicação do laser por meio da sobredosagem da associação de Cetamina (180 mg/Kg) com Xilazina (30 mg/Kg), administrada pela via intraperitoneal. Na figura 1 estão sumarizadas as etapas realizadas ao longo do experimento.

Tabela 2- Protocolo terapêutico aplicado nos diferentes grupos de tratamento

Comprimento de onda	Energia/ponto	Tempo (s)	Densidade energética (DE)	Número de pontos	Potência do aparelho	Spot	Densidade de potência (DP)
GC	NSA	10	NSA	1	NSA	NSA	NSA
GV	1 J	10	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²
GI	1 J	10	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²
GVI	0,5 + 0,5	5	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²

*NSA: Não se aplica

5.2.2 Avaliação clínica

Os animais foram avaliados clinicamente 24 horas após cada aplicação do laser, sendo considerados os seguintes parâmetros: hemorragia local, claudicação, perda de peso, reflexo de propriocepção, redução da movimentação no recinto e ascensão das lesões para o abdome. Para avaliação dos resultados, os parâmetros foram classificados como presentes ou ausentes.

5.2.3 Coleta de amostras

Após a eutanásia dos animais, o músculo gastrocnêmio submetido à inoculação da peçonha e o contralateral foram dissecados e coletados. Na sequência, ambos foram pesados em uma balança analítica. Além disso, fragmentos do músculo direito foram armazenados a -80° C para posterior mensuração dos níveis enzimáticos musculares.

Imediatamente após a eutanásia foram coletados também 2 mL de sangue total, por meio de punção cardíaca. O material colhido foi dispensado em tubos heparinizados, os quais foram centrifugados por 10 minutos e, posteriormente, o soro obtido foi dividido em alíquotas destinadas à análise enzimática sérica.

5.2.4 Atividade edematogênica

A pesagem das amostras permitiu avaliar a diferença entre as massas dos músculos submetidos aos efeitos da peçonha e os que receberam apenas a solução fisiológica, de modo que o valor adicional observado foi considerado resultado da formação de edema (TEIXEIRA et al., 2003; BARBOSA et al., 2010). Diante disso, identificou-se as diferenças entre os

protocolos adotados em cada um dos grupos experimentais em relação aos efeitos do laser sobre a atividade edematogênica no tecido muscular.

5.2.5 Análises enzimáticas

Fragmentos de 0,2 gramas dos músculos dissecados foram homogeneizados em 4 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) e vortexizados por 10 segundos. Na sequência, foi adicionado 1 mL de PBS com 0,5% do reagente Triton-X com centrifugação do material (5000g/5min). Posteriormente, o sobrenadante foi diluído em PBS na proporção de 1:35 (v:v) e a solução obtida foi utilizada para a análise bioquímica. Foi realizada a técnica espectrofotométrica no aparelho Bioplus (Bio-2000 ®) destinado à análise bioquímica úmida para mensuração dos níveis das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Creatina Quinase (CK) nos músculos. Para isso, foram utilizados os kits comerciais Transaminase AST cinética (Bioclin ®) e CK-NAC Liquiform (Labtest®), respectivamente (BARBOSA et al., 2010; NARCISO et al., 2018).

Também foi realizada a espectrofotometria utilizando o aparelho Bioplus (Bio-2000 ®) para mensuração das enzimas sistêmicas (AST e CK) utilizando os mesmos kits comerciais. Os valores encontrados foram comparados entre os grupos.

5.2.6 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk, havendo normalidade dos dados em relação à variável avaliada foi realizado o teste ANOVA seguido do teste t de Student (_ post hoc _). Para variáveis que não apresentaram distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-whitney (_ post hoc _). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e incluída a correção de Bonferroni para os testes _ post hoc _. Para avaliação das variáveis clínicas aplicou-se o teste qui-quadrado considerado significativo quando $p < 0,05$.

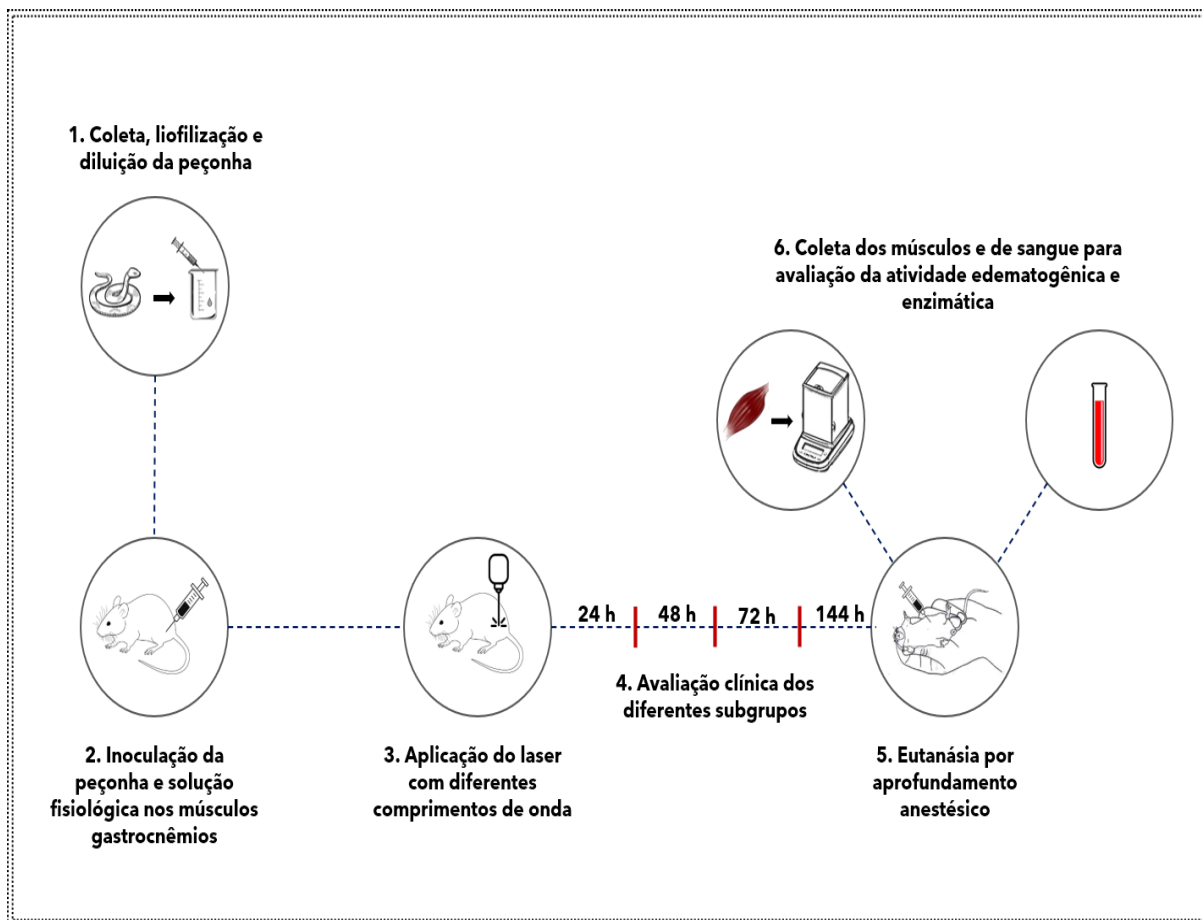


Figura 1- Resumo das atividades experimentais desenvolvidas. 1. A peçonha bruta de serpentes *Bothrops leucurus* foi diluída em solução salina a 0,9%. 2. Foram inoculados 50 µl de peçonha no músculo gastrocnêmio direito e o mesmo volume de solução salina no músculo contralateral. 3. O laser foi aplicado com DE de 10J/cm² em todos os animais independente do comprimento de onda utilizado (técnica pontual). 4. A avaliação clínica de todos os animais foi feita a cada 24 horas. 5. A eutanásia foi realizada por meio de aprofundamento anestésico. 6. Os músculos gastrocnêmios esquerdo e direito foram coletados para averiguação da atividade edematogênica e enzimática muscular e o sangue para análise enzimática sérica.

5.3 Resultados

A peçonha da serpente *B. leucurus* ocasionou alterações de todas as variáveis clínicas analisadas, com exceção da ascensão das lesões para a região abdominal, que não foi observada em nenhum animal. Todos os grupos experimentais apresentaram alterações clínicas após a inoculação da peçonha, sendo que o grupo controle apresentou alterações mais intensas e duradouras (Tabela 3).

Observou-se redução progressiva da hemorragia local em todos os grupos experimentais. À primeira avaliação clínica, realizada 24 horas após a inoculação da peçonha, essa alteração foi registrada em 100% dos animais do GC, 71,40% do GV, 85,70% do GI e

42,90% do GVI. Após 144 horas da inoculação da peçonha, hemorragia local estava ausente em todos os grupos tratados, sendo mantida em 42,90% dos animais do GC.

Claudicação foi observada em 100% dos animais até 72 horas após a inoculação da peçonha no GC, GV e GI. No GVI, por sua vez, a alteração estava presente apenas em 42,90% dos animais após a terceira sessão de fotobiomodulação. Além disso, na última avaliação clínica (144 horas após a inoculação da peçonha), 100% dos animais do GC e GI e 85,70% do GV ainda claudicavam, o que foi notado em somente 28,60% dos indivíduos do GVI.

Vinte e quatro horas após a inoculação da peçonha o reflexo de propriocepção estava presente em 33,33% dos camundongos do GC, 57,10% no GV, 71,40% no GI e 100% no GVI, que foi o único grupo em que tal parâmetro permaneceu inalterado após uma única aplicação do laser (Figura 2 e vídeo suplementar 1). Além disso, 72 horas após a inoculação da peçonha (três aplicações do laser) o reflexo de propriocepção estava presente em 100% dos animais dos grupos tratados, ao passo que, no GC ainda estava ausente em 28,60% dos animais.

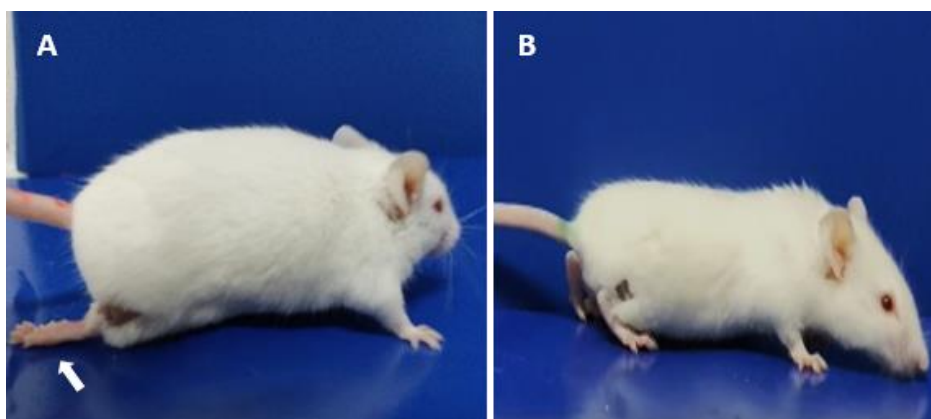


Figura 2: Avaliação do reflexo de propriocepção. A- Animal do GC 24 horas após a inoculação da peçonha com reflexo de propriocepção ausente (seta). B- Animal do GVI com reflexo de propriocepção presente 24 horas após a aplicação da peçonha. GC: grupo controle; GVI: grupo tratado com laser vermelho e infravermelho.

Houve redução da movimentação nos animais de todos os grupos. Apesar disso, na primeira avaliação clínica realizada (24 horas após a inoculação da peçonha), a movimentação se manteve normal em 71,40% dos componentes do GVI. Adicionalmente, a partir da segunda sessão de fotobiomodulação, os animais desse grupo não apresentavam mais a alteração em questão. Na última avaliação realizada (144 horas após a inoculação da peçonha), os animais do GV e GI não apresentavam mais redução da movimentação, enquanto essa alteração foi notada em 14,30% dos camundongos do GC.

De modo geral, os animais perderam peso após serem submetidos aos efeitos da peçonha botrópica. Na última avaliação clínica (144 horas após a inoculação da peçonha), o GVI apresentou o menor número de animais com peso inferior ao inicial (14,30%). Houve redução

do peso inicial em 70,40% dos indivíduos do GC, 42,90% do GV e do GI e 21,40% do GVI (considerando todos os tempos de tratamento avaliados). Vale salientar que o GVI se destacou em relação à redução de todas as variáveis estudadas quando comparado aos demais grupos tratados e ao controle.

Tabela 3 – Frequência (%) das alterações clínicas observadas nos diferentes grupos experimentais

Variáveis			Hemorragia local (%)	p	X ²	Claudicação (%)	p	X ²
GC	24 h	Sim	100,00	0,166	5,08	100,00	1,00	0,00
	48 h	Sim	71,40			100,00		
	72 h	Sim	71,40			100,00		
	144 h	Sim	42,90			100,00		
GV	24 h	Sim	71,40	0,022	9,66	100,00	0,375	3,11
	48 h	Sim	42,90			100,00		
	72 h	Sim	14,30			100,00		
	144 h	Sim	0,00			85,70		
GI	24 h	Sim	85,70	0,007	12,00	100,00	1,00	0,00
	48 h	Sim	71,40			100,00		
	72 h	Sim	42,90			100,00		
	144 h	Sim	0,00			100,00		
GVI	24 h	Sim	42,90	0,241	4,20	100,00	0,004	13,60
	48 h	Sim	42,90			100,00		
	72 h	Sim	28,60			42,90		
	144 h	Sim	0,00			28,60		
TOTAL	GC	Sim	70,40	0,007	12,20	100,00	<0,001	24,70
	GV	Sim	32,10			96,40		
	GI	Sim	50,00			100,00		
	GVI	Sim	28,60			67,90		

Diferença significativa quando $p < 0,05$. GC: grupo controle, GV: grupo vermelho, GI: grupo infravermelho, GVI: grupo vermelho + infra. Hemorragia local (H.L), claudicação (Cl.), redução da movimentação (R.M), reflexo de propriocepção (R.P) e perda de peso (P.P).

Quanto à atividade edematogênica, macroscopicamente observou-se aumento do volume do músculo do gastrocnêmio direito em relação ao esquerdo em todos os grupos (Figura 3), principalmente nos dois primeiros tempos de observação (24 e 48 horas após a inoculação da peçonha). Após a comparação entre as massas dos músculos direito e esquerdo, notou-se que a peçonha botrópica provocou aumento da atividade edematogênica em todos os grupos. No grupo não tratado (GC) observou-se aumento da massa muscular do gastrocnêmio direito em

relação ao esquerdo de 109,00% (atividade edematogênica) 24 horas após a inoculação da peçonha.

Quando comparados ao GC, 24 horas após a inoculação da peçonha (uma aplicação do laser nos grupos tratados), os grupos tratados apresentaram menor diferença entre as massas do músculo direito e o contralateral, havendo redução de 52,46% da atividade edematogênica mediante a aplicação do laser vermelho (GV), 67,59% do infravermelho (GI) e 86,76% dos comprimentos de onda associados (GVI). Ao considerar todos os tempos de tratamento, a redução do edema observada foi de 41,21% no GV, 42,40% no GI e de 56,06% no GVI.

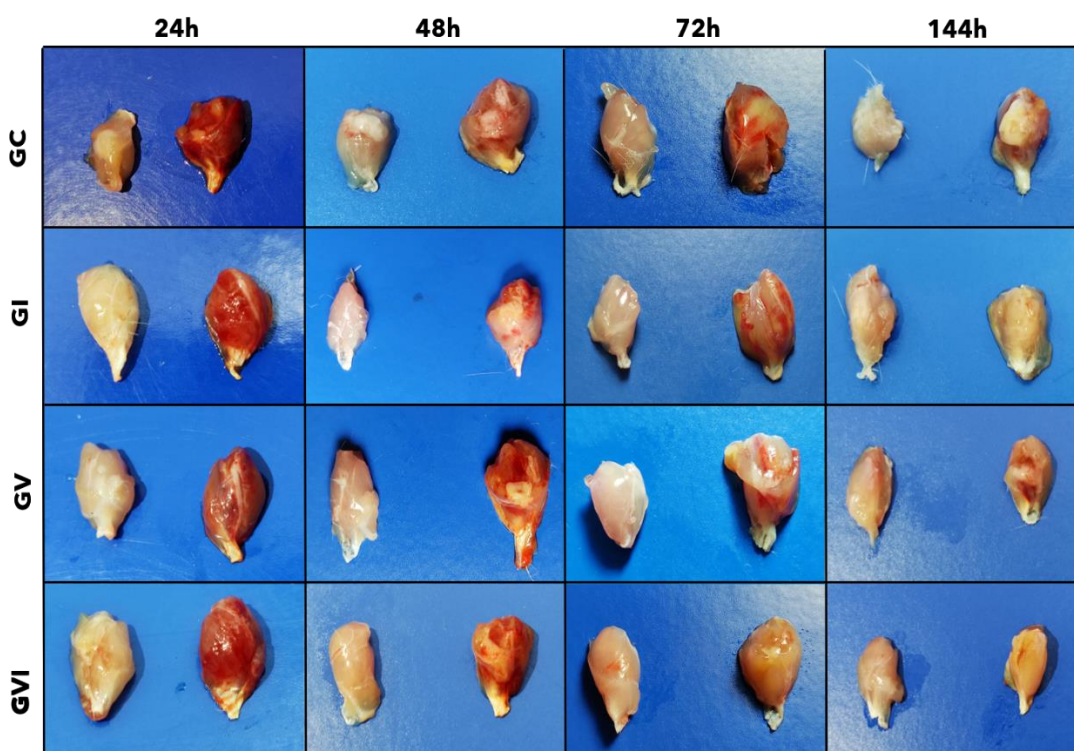


Figura 3- Músculos gastrocnêmios de animais submetidos aos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Músculo gastrocnêmio direito aumentado de tamanho em relação ao contralateral e de coloração intensamente avermelhada (24 horas). Alterações menos intensas nos subgrupos avaliados 48, 72 e 144 horas após a inoculação da peçonhaGC: grupo controle, GV: grupo vermelho, GI: grupo infravermelho, GVI: grupo vermelho + infra.

A atividade edematogênica no músculo gastrocnêmio submetido à inoculação da peçonha botrópica foi significativamente maior no GC quando comparado a todos os grupos tratados e houve redução significativa do edema no GVI em relação ao GV e ao GI (Figura 4A). Quanto aos tempos de tratamento, identificou-se redução significativa dos efeitos avaliados 144 horas após a inoculação da peçonha (aplicação de seis sessões de fotobiomodulação) em relação ao tempo 24 horas (aplicação de uma sessão de fotobiomodulação), independentemente

do comprimento de onda utilizado (Figura 4C-E). Não houve diferença entre os tempos de observação da variável edema no GC (Figura 4B).

Além disso, 24, 48, 72 e 144 horas após a inoculação da peçonha todos os grupos tratados apresentaram atividade edematogênica significativamente menor quando comparados ao GC, de modo que a diferença foi mais significativa entre os indivíduos não tratados e o os do GVI. Ademais no último tempo avaliado a variável em questão se mostrou significativamente menor no GVI quando comparado ao GV (Figura 4F).

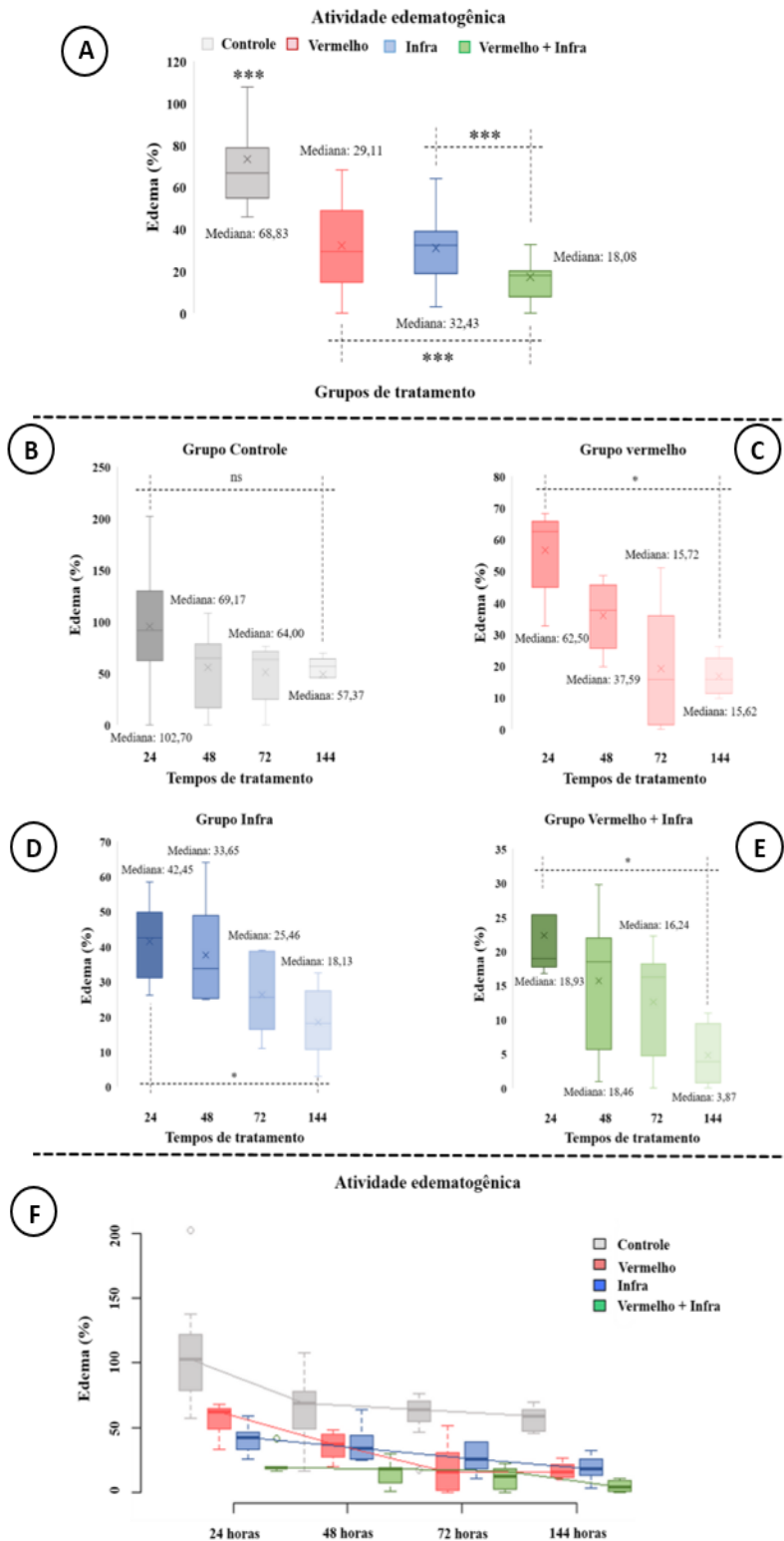


Figura 4 - Atividade edematogênica - Comparações entre grupos: A: Vermelho x controle ($U = 67,00$), infra x controle ($U = 39,00$), vermelho + infra x controle ($U = 11$), vermelho + infra x vermelho ($U = 132$), infra x vermelho + infra ($U = 99$). *** $p < 0,001$. B: Atividade edematogênica - Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC): Não houve diferença significativa. C: Atividade edematogênica- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$). ** $p < 0,01$. D: Atividade edematogênica- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o

laser infravermelho (GI): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas ($W = 34$ e $p = 0,026$).
* $p < 0,05$. E: Atividade edematogênica - Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com os comprimentos vermelho + infra (GVI): Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$).

Quanto aos níveis séricos de CK, observou-se aumento significativo no GC em relação a todos os grupos tratados ao passo que, entre os grupos tratados, a concentração sérica de CK foi significativamente menor no GVI quando comparado ao GV e ao GI (Figura 5A). Ademais, no GV e no GI notou-se decréscimo significativo da concentração no tempo de 144 horas quando comparado a 24 horas (Figura 5C-D); no GVI o nível sérico da enzima foi significativamente menor em todos os tempos comparados ao de 24 horas (Figura 5E) e no GC houve diferença entre os tempos de 24 e 144 horas e 48 e 144 horas (Figura 5B).

Ademais, 24 horas após a inoculação da peçonha o nível sérico de CK significativamente menor no GVI quando comparado ao GC, a medida que nesse tempo de avaliação os demais grupos tratados não diferiram do controle. Por outro lado, 48 horas após a inoculação todos os grupos tratados demonstraram concentração enzimática significativamente menor que no grupo controle e a diferença mais expressiva foi observada entre o GVI e o GC. Todos os grupos tratados apresentaram concentração menor de CK quando comparados ao não tratado 72 horas após a inoculação da peçonha, além disso, observou-se menor nível sérico da enzima em questão no GVI relação ao GV e ao GI (Figura 5F).

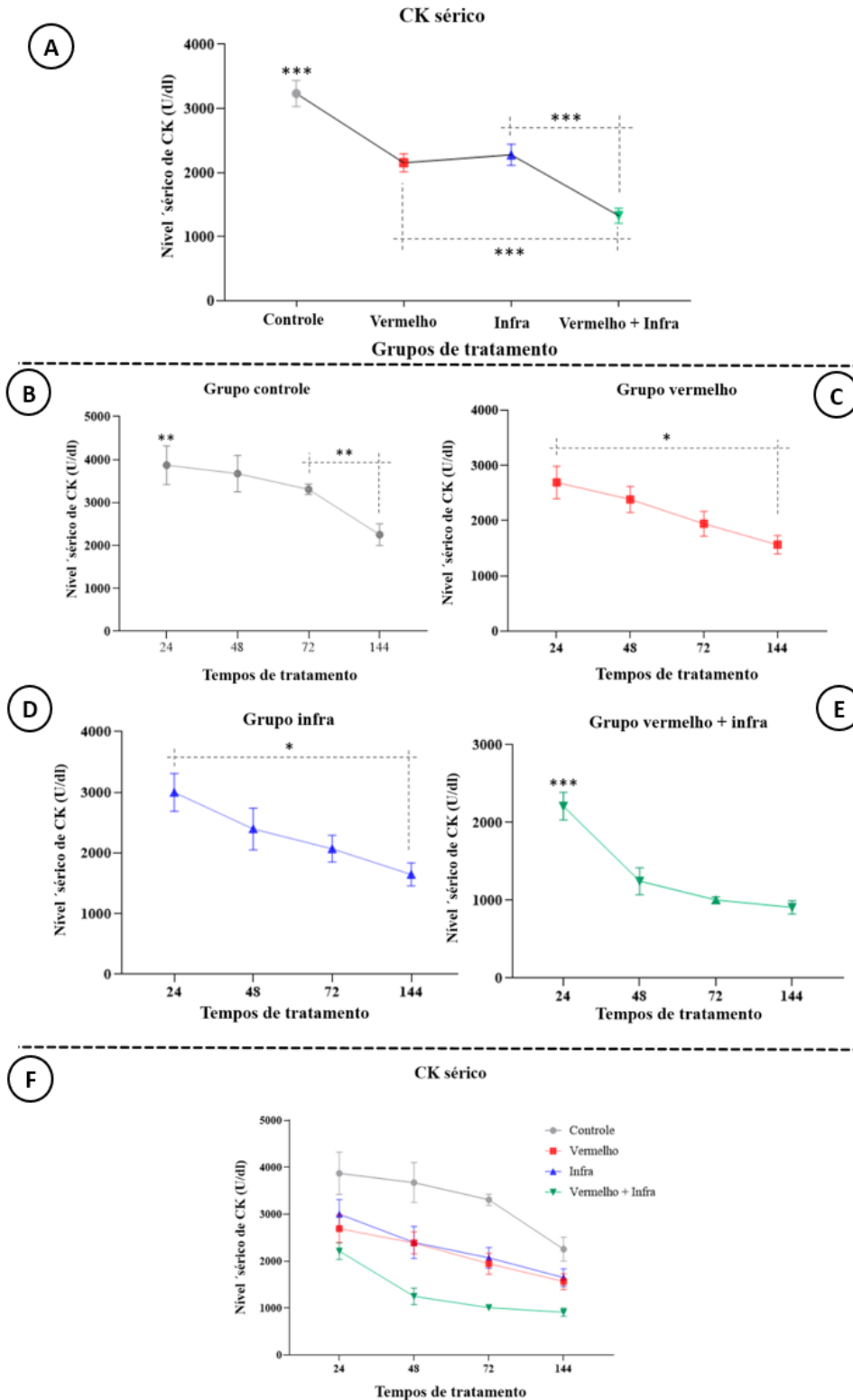


Figura 5 - Níveis séricos de CK: Comparação entre os grupos experimentais. A: Vermelho x controle ($t = 6,382$ e $p < 0,001$), infra x controle ($t = 5,476$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x controle ($t = 10,790$ e $p < 0,001$), infra x vermelho + infra ($t = 5,163$ e $p < 0,001$), vermelho x vermelho + infra ($t = 4,556$ e $p < 0,001$). B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 144 horas ($t = 3,486$ e $p = 0,013$) e 48 x 144 ($t = 3,060$ e $p = 0,036$). * $p < 0,05$. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença os tempos de 24 x 144 horas ($t = 3,435$ e $p = 0,014$). * $p < 0,05$. D: Comparações entre

os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Houve diferença os tempos de 24 x 144 horas ($t = 3,491$ e $p = 0,014$). * $p < 0,05$. E: Níveis séricos de CK- Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença entre os tempos 24 x 48 horas ($t = 5,123$ e $p < 0,001$), 24 x 72 ($t = 6,822$ e $p < 0,001$) e 24 x 144 ($t = 6,187$ e $p < 0,001$).

Além disso, o nível sérico de AST foi significativamente maior no GC quando comparado aos grupos tratados, sendo que no GVI sua concentração foi significativamente menor em relação aos demais grupos submetidos à fotobiomodulação (GV e GI) (Figura 6A). Considerando essa variável, houve diminuição significativa entre os tempos de 24 e 144 horas no GC (Figura 6B) e GVI (Figura 6E) e entre 48 e 144 horas no GV (Figura 6C), GI não houve diferença significativa entre os tempos de tratamento (Figura 6D).

O GVI foi o único grupo tratado que, 24 horas após a inoculação da peçonha, apresentou menor concentração sérica de AST quando comparado ao GC e 48 horas após a inoculação o nível sérico da enzima foi significativamente menor nesse grupo que o observado em todos os demais grupos. Todos os grupos tratados demonstram menor concentração de AST quando em relação ao não tratado 72 horas após a inoculação da peçonha e após a última avaliação notou-se redução da variável em todos os grupos tratados quando comparados ao controle, de modo que, no GVI houve redução também relação aos demais grupos tratados (Figura 6E).

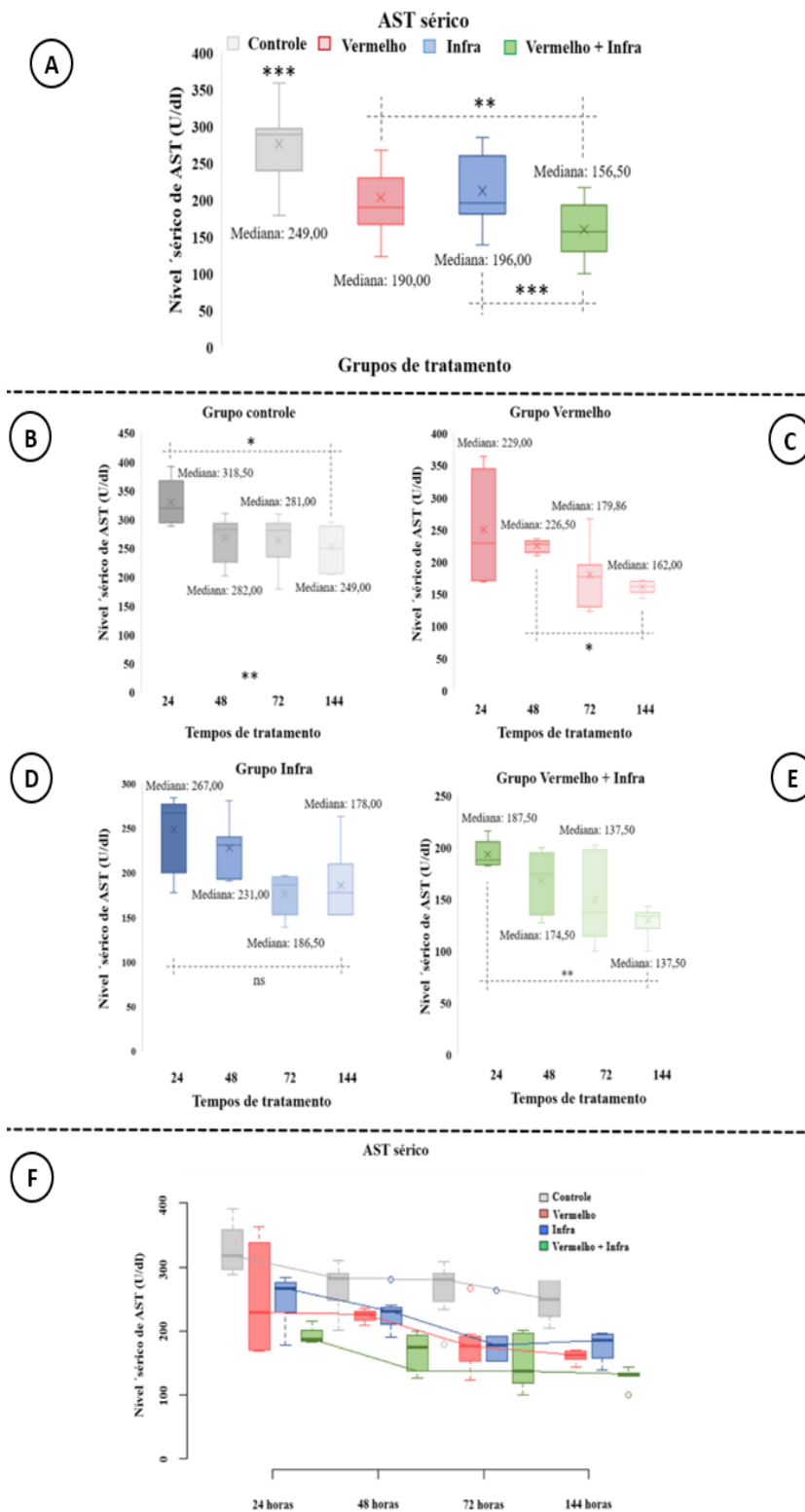


Figura 6 - Níveis séricos de AST: Comparações entre os diferentes grupos experimentais. A: Vermelho x controle ($U = 101,00$ e $p < 0,001$), infra x controle ($U = 101,00$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x controle ($U = 15$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x vermelho ($U = 165$ e $p = 0,007$), infra x vermelho + infra ($U = 131$ e $p < 0,001$). B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 144 ($W = 40,5$ e $p = 0,039$). C: Comparações entre os diferentes de tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença os tempos de 48 x 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$). D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Não diferença significativa entre os tempos de avaliação. E: Comparações entre os

diferentes de tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença entre os tempos E- 24 x 144 horas ($W = 36$ e $p = 0,013$).

Também houve diferença estatística significativa entre o GC e todos os grupos tratados quanto à concentração muscular de CK, sendo que a concentração foi maior nos grupos tratados. O GVI diferiu significativamente do GV e do GI, apresentando a maior concentração dessa enzima nos músculos avaliados (Figura 7A). No GC notou-se que no tempo de 24 horas o nível da enzima no músculo foi menor que o observado em todos os demais e entre o tempo de 48 e 72 horas houve aumento da concentração (Figura 7B). Nos demais grupos a diferença foi observada entre a primeira aplicação do laser (menor concentração) e todas as outras (Figura 7C-E).

Quanto aos diferentes tratamentos em cada período de avaliação, 24 e 48 horas após a inoculação a concentração muscular de CK mostrou-se significativamente maior nos grupos tratados em relação ao controle e a diferença mais significativa se deu entre o GC e o GVI. Além disso, 72 e 144 horas após a inoculação da peçonha a enzima apresentou maior concentração nos grupos tratados quando comparados ao controle e o GVI diferiu ainda do GV e GI, apresentado a maior concentração muscular de CK entre os grupos tratados.

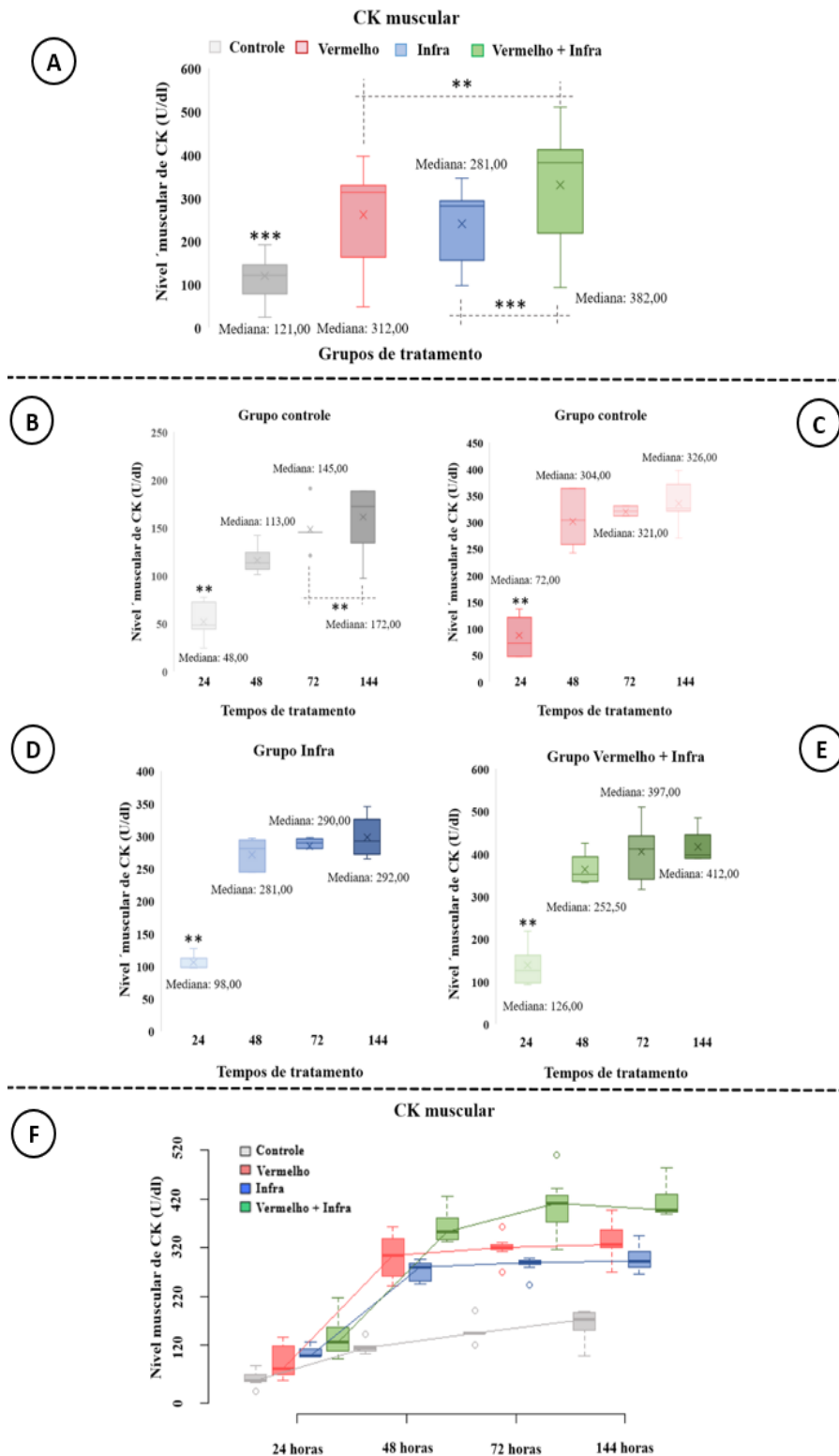


Figura 7 - Níveis musculares de CK. A: Vermelho x controle ($U = 131,00$ e $p < 0,001$), infra x controle ($U = 123,00$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x controle ($U = 78,5$ e $p < 0,001$), vermelho + infra x vermelho ($U = 199$ e $p = 0,003$), infra x vermelho + infra ($U = 169$ e $p < 0,001$). B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Houve diferença entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,019$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,01$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,012$), 48 x 144 ($W = 1,00$ e $p = 0,025$). C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,013$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,013$). D: Comparações entre os diferentes tempos de

tratamento com o laser infravermelho (GI). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,012$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,012$). E: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Houve diferença significativa entre os tempos 24 x 48 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,007$), 24 x 72 horas ($W = 0,00$ e $p = 0,013$) e 24 x 144 ($W = 0,00$ e $p = 0,013$).

5.4 Discussão

No presente estudo os animais submetidos ao tratamento com a luz laser apresentaram menores percentuais das variáveis clínicas e atividade edematogênica e menor nível sérico de CK e AST quando comparados aos indivíduos não tratados, o que indica efetividade do protocolo estabelecido. Quanto às modificações nos parâmetros clínicos avaliados em todos os grupos eram esperadas, tendo em vista que a dose de peçonha botrópica utilizada tem potencial de indução de danos em 80% das células do tecido alvo (BARBOSA et al., 2009), o que resulta nas manifestações clínicas descritas. Em contrapartida, é sabido que a fotobiomodulação exerce atividade citoprotetora sobre células musculares submetidas aos efeitos da peçonha botrópica, visto que aumenta a viabilidade dos miócitos e reduz o índice de morte celular por necrose e apoptose (GOUVEIA et al., 2020), o que justifica a redução das variáveis clínicas avaliadas nos grupos tratados quando comparadas ao controle.

Assim como no presente estudo, Dourado et al. (2003) observaram redução progressiva da hemorragia muscular em indivíduos submetidos à inoculação da peçonha da serpente *B. moojeni* e tratados com o laser infravermelho quando comparados aos animais não tratados. Sugere-se que tal resposta esteja associada à atividade citoprotetora desempenhada pelos comprimentos de onda vermelho e infravermelho isoladamente sobre células endoteliais submetidas aos efeitos da peçonha botrópica, que se deve à preservação das membranas plasmáticas dessas células e redução da liberação de IL-1 β (FRANCO et al., 2016). Vale salientar que, nos grupos tratados do presente estudo, a alteração não foi mais observada nos subgrupos tratados durante 144 horas (seis aplicações do laser), o que indica que esse tempo de tratamento culminou com os melhores efeitos em relação a tal variável.

Entende-se que a claudicação e a redução da movimentação observadas mediante a aplicação da peçonha se devem em grande parte à dor, que é a manifestação clínica mais comum nas vítimas de acidentes botrópicos (presente em 90,8% dos indivíduos) (SOUZA et al., 2018), o que explica a permanência da claudicação em todos os animais do GC e seu maior índice de redução da movimentação na última avaliação clínica em relação aos demais grupos. Quanto à melhora da claudicação no GV e GVI após 144 horas de tratamento (seis aplicações do laser),

sabe-se que o laser vermelho reduz a hiperalgesia ocasionada pela peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* por meio da inativação de nociceptores espinais responsivos a bradicinina, que têm sua concentração reduzida como efeito da fotobiomodulação (NADUR-ANDRADE et al., 2016), o que pode justificar esse resultado.

Sugere-se que a perda do reflexo de propriocepção observada nos diferentes grupos seja decorrente da capacidade das fosfolipases A2 presentes na peçonha botrópica de induzir bloqueio neuromuscular, o que pode culminar com paralisia muscular e redução dos reflexos locais (PONCE-OTO et al., 2009; SCHEZARO-RAMOS et al., 2017). Por outro lado, o bloqueio neuromuscular observado nessas situações é reduzido pelo comprimento de onda vermelho, que leva ao aumento da liberação de acetilcolina e facilita a transmissão neuromuscular na região afetada. Além disso, resultados mais efetivos são observados quando se faz ao menos três aplicações do laser (DOIN-SILVA et al., 2009). Embora não haja registros dos efeitos do comprimento de onda infravermelho no tratamento do bloqueio neuromuscular nesse tipo de lesão, de modo geral o laser de baixa potência mantém a integridade dos receptores de acetilcolina presentes no músculo esquelético, além de estimular sua expressão após insultos (FREITAS & HAMBLIN, 2016). Isso pode justificar o reestabelecimento dessa variável em todos os grupos tratados após a terceira aplicação do laser.

Sabe-se que a interação entre a luz laser vermelha e a infravermelha culmina com efeitos positivos no tratamento de lesões de nervos periféricos e que, quando combinadas, se mostram mais efetivas em relação ao seu uso isolado (GIGO-BENATO et al., 2004). Além disso, a fotobiomodulação, com ambos os comprimentos de onda, estimula a liberação de fatores neurotróficos, a exemplo do fator de crescimento nervoso (NGF), que tem atividade citoprotetora e regenerativa sobre neurônios simpáticos e sensitivos do sistema nervoso periférico (ROCHKIND et al., 2013). Desse modo, sugere-se que o comprimento de onda visível e o invisível associados atuam sobre o tecido de forma sinérgica, o que resulta na potencialização dos efeitos observados em relação a utilização individual dos comprimentos de onda e justifica a permanência do reflexo de propriocepção em todos os animais do GVI 24 após a primeira aplicação de laser.

O aumento da atividade edematogênica ocasionado pela peçonha da serpente *B. leucurus* é mediado, principalmente, pelas metaloproteases que a compõem, que provocam aumento da permeabilidade vascular. Além disso, mediadores endógenos que atuam nessa situação, como óxido nítrico, bradicinina e prostaciclina aumentam o fluxo sanguíneo local e

contribuem para a formação do edema (GREMSKI et al., 2007). Lauria et al. (2021) identificaram percentual edematogênico semelhante (aproximadamente 100%) ao observado no presente estudo como efeito da peçonha de *B. leucurus*. Ademais, esses autores também não identificaram diferença significativa entre os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho.

Quanto ao uso dos comprimentos de onda separadamente, Barbosa et al. (2008) observaram redução de 53% da resposta edematogênica ocasionada pela peçonha da serpente *B. jararacussu* após uma única aplicação do laser vermelho, índice semelhante ao encontrado no presente estudo. Nadur-Andrade et al. (2014) registraram redução de 69,2% do edema provocado pela peçonha botrópica como efeito do comprimento de onda vermelho, o que também se assemelha aos resultados demonstrados. A fotobiomodulação é utilizada com sucesso no tratamento de lesões inflamatórias musculoesqueléticas, uma vez que a interação entre a luz laser e o tecido lesionado pode reduzir os níveis de COX-2 e PGE-2 (BERTOLINI et al., 2008) e estimular a liberação de hormônios adrenais que inibem a atividade das fosfolipases A2 e, por consequência, atenuam o processo inflamatório e o edema resultante (ALBERTINI et al., 2004).

O edema observado em vítimas de acidentes ofídicos se desenvolve rapidamente e pode durar semanas ou meses quando não tratado (WAIDDYANATHA et al., 2019), o que pode justificar a permanência da atividade edematogênica nos animais não tratados e ausência de diferença significativa entre os tempos de avaliação. A diferença observada entre os tempos de 24 horas (uma aplicação do laser) e 144 horas (seis aplicações do laser) nos grupos tratados indica que, com base no protocolo adotado, os resultados são mais expressivos após seis aplicações do laser, independente do comprimento de onda utilizado. Vale destacar que a redução da atividade edematogênica observada como efeito da primeira aplicação de laser evidencia a efetividade dos diferentes comprimentos de onda na modulação dessa variável.

As enzimas CK e AST são importantes marcadores bioquímicos associados a lesões musculares agudas e sua concentração sérica sabidamente demonstra de forma satisfatória os efeitos da fotobiomodulação sobre a mionecrose induzida pela peçonha botrópica (DOURADO et al., 2017). A diferença observada no presente estudo entre os grupos tratados e o controle em relação às enzimas séricas estudadas indica que, de forma independente do comprimento de onda utilizado, o laser de baixa potência reduz os danos resultantes da atividade mionecrótica da peçonha da serpente *B. leucurus*.

A CK é uma enzima citosólica que, por apresentar baixo peso molecular (40 KDa cada subunidade), é facilmente liberada das células musculares, de modo que sua concentração sérica se eleva rapidamente mediante danos moderados e intensos (MCLEISH & KENYON, 2005). Assim sendo, entende-se que o aumento do nível sérico da enzima em questão, bem como a redução da sua concentração muscular nos grupos não tratados em detrimento dos tratados demonstra o efeito citoprotetor da fotobiomodulação sobre as células musculares, estando esses resultados de acordo com outros estudos desenvolvidos (DOURADO et al., 2003; BARBOSA et al., 2009; DOIN-SILVA et al., 2009). Salienta-se que Lauria et al. (2021) também não relataram diferença significativa entre os efeitos dos comprimentos de onda visível e invisível sobre esse marcador.

De modo semelhante, a elevação do nível sérico de AST é observada como resultado de lesões musculares. Como a maior concentração dessa enzima é observada no interior das mitocôndrias das células musculares, isso faz com o pico de liberação seja observado entre 24 e 48 horas após o insulto causador da lesão (BRANCACCIO et al., 2010). Dourado et al. (2017) também observaram redução progressiva da concentração de ambas as enzimas séricas ao longo do tempo, de forma que a redução mais expressiva se deu no sétimo dia de tratamento.

Ao considerar as variáveis de interesse no presente estudo, nota-se que o GVI se destacou em relação ao uso dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho individualmente. Além disso, as alterações clínicas foram moduladas de forma mais efetiva nesse grupo em todos os tempos de tratamento. Embora os efeitos dessa associação sobre as lesões ocasionadas pela peçonha botrópica ainda não tenham sido descritas na literatura, é possível sugerir que a intensificação dos efeitos da fotobiomodulação nesse caso se deve à interação entre os mecanismos de ação dos comprimentos de onda.

Comprimentos de onda entre 600 e 700 nm (vermelho) interagem melhor com a melanina e a hemoglobina, cromóforos localizados em regiões mais superficiais do corpo, o que faz com que sua absorção e atuação sejam mais efetivas em tecidos e lesões menos profundos. Em contrapartida, o infravermelho (780 a 1100 nm) interage de maneira mais significativa com a água, logo, seus efeitos alcançam profundidades maiores (CHUNG et al., 2012). Outro aspecto a considerar é que a afinidade do infravermelho pela água estimula a interação entre essa molécula e outros componentes celulares e intensifica reações bioquímicas e biofísicas que dela dependem (SANTANA-BLANK et al., 2010).

Além disso, embora o comprimento vermelho atue mais diretamente sobre as mitocôndrias e o infravermelho sobre a membrana plasmática das células, ambos são absorvidos pela enzima citocromo c oxidase, o que resulta no reestabelecimento da atividade metabólica celular, representado principalmente pela produção de adenosina trifosfato (ATP) (FREITAS & HAMBLIN, 2016). Sendo assim, sugere-se que a potencialização dos efeitos da fotobiomodulação pode estar associada também à maior disponibilidade de água para o desenvolvimento das reações químicas e transporte de substâncias, bem como à recuperação da capacidade de produção energética celular necessária para tal que, nesse caso, pode ser estimulada por meio de dois mecanismos distintos.

5.5 Conclusão

A fotobiomodulação atenuou as alterações clínicas avaliadas no presente estudo, assim como a atividade mionecrótica da peçonha da *B leucurus*, o que se confirmou por meio da redução de CK e AST séricas nos grupos tratados. Os comprimentos de onda associados resultaram na melhor resposta clínica entre os grupos tratados, assim como a reduziu mais significativamente as enzimas séricas e aumentou a concentração muscular de CK quando comparados ao tratamento com a luz laser vermelha e infravermelha utilizadas isoladamente. Todavia, novos estudos se fazem necessários para uma melhor compreensão das respostas observadas, visto que, ainda não se conhece os mecanismos responsáveis pelos efeitos da interação entre a luz laser vermelha e a infravermelha.

6 CAPÍTULO II

A associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho reduz a inflamação e aumenta a deposição de colágeno em lesões ocasionadas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus*

Resumo

Inflamação e hemorragia são algumas das principais lesões locais ocasionadas pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus* e estão associadas aos efeitos das fosfolipases e metaloproteases que a compõem. As alterações musculares decorrentes de acidentes botrópicos resultam em sequelas permanentes decorrentes da deficiência do processo de regeneração observada nessas situações. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, separadamente e associados, sobre o processo inflamatório e a deposição de colágeno na lesão muscular causada pela peçonha da serpente *B. leucurus*. Foram utilizados 112 camundongos e em todos a peçonha foi inoculada no músculo gastrocnêmio direito, na dose de 0,6mg/kg, diluída em 50 µl de solução salina. Os animais foram divididos em quatro grupo (28 animais cada), sendo um controle (GC) e três grupos tratados: 1) laser vermelho ($\lambda=660$ nm) (GV), 2) laser infravermelho ($\lambda=808$ nm) (GI) e 3) laser vermelho ($\lambda=660$ nm) + infravermelho ($\lambda=808$ nm) (GVI). Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos, de acordo com a duração de aplicação do tratamento (24, 48, 72 e 144 horas). Foi utilizado o laser diodo (0,1 W, CW, 1J/ponto, DE: 10 J/cm²), aplicado com intervalos de 24 horas. A eutanásia foi realizada 24 horas após a última sessão de tratamento em cada subgrupo, para coleta dos músculos gastrocnêmios e processamento das amostras para avaliação histomorfométrica das lesões. Ambos os comprimentos de onda reduziram a intensidade da inflamação em relação ao grupo controle e a associação entre eles intensificou significativamente a resposta anti-inflamatória observada. A fotobiomodulação também provocou modificação do tipo de infiltrado inflamatório observado e o GVI apresentou o maior percentual de células mononucleares em relação aos demais grupos. A intensidade da hemorragia foi significativamente menor nos animais tratados e o GVI apresentou a maior quantidade de indivíduos em que a variável foi classificada como discreta. Quanto à deposição de colágeno, observou-se aumento significativo no GV em relação ao GC, GVI e GC e GVI e GI. A fotobiomodulação se mostrou eficaz no tratamento da inflamação e hemorragia ocasionadas pela peçonha da serpente *B. leucurus* e estimulou a deposição de colágeno durante o reparo tecidual. A associação entre os comprimentos de onda foi melhor em relação aos tratamentos isolados.

Palavras-chave: fotobiomodulação; músculo esquelético; infiltrado inflamatório; reparo tecidual.

6.1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma das principais lesões locais ocasionadas pela peçonha da serpente *B. leucurus*, uma vez que as fosfolipases A2 que a compõem estimulam a liberação de mediadores inflamatórios, o que culmina com o aumento da taxa de migração e adesão leucocitária (MARANGONI et al., 2013; BRAGA et al., 2021). Por sua vez, as metaloproteases presentes na peçonha botrópica são as principais responsáveis pela severa hemorragia observada em vítimas de acidentes ofídicos que envolvem esse gênero, visto que elas provocam instabilidade dos capilares sanguíneos e reduzem a taxa de agregação plaquetária (SOUSA et al., 2020).

As metaloproteases podem ainda degradar colágeno e, por consequência, retardar o processo de reparo tecidual (MAZZI et al., 2007). Além disso, a ação direta da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* sobre a microvasculatura local pode retardar o processo de reparo tecidual, dado que a perfusão sanguínea adequada é indispensável para o reestabelecimento dos constituintes teciduais lesionados (NETO & MARQUES, 2005). Diante disso, as alterações musculares decorrentes de acidentes botrópicos, frequentemente, estão associadas a sequelas permanentes que resultam da deficiência do processo de regeneração observada nessas situações (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Nesse contexto, a fotobiomodulação tem sido utilizada no tratamento de lesões ocasionadas pela peçonha botrópica e demonstra resultados efetivos em relação à redução da inflamação (BARBOSA et al., 2008), hemorragia (DOURADO et al., 2008) e mionecrose (BARBOSA et al., 2009). Ademais, é sabido que a luz laser tem efeitos expressivos no tratamento de alterações do sistema locomotor (SOUZA & SILVA) e que a deposição de colágeno é estimulada pelos comprimentos de onda vermelho e infravermelho durante o processo de reparo tecidual (CUNHA et al., 2019). Porém, ainda não são conhecidos os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho associados sobre o tecido muscular submetido à inoculação da peçonha botrópica.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, separadamente e associados, sobre o processo inflamatório e a deposição de colágeno no músculo gastrocnêmio de camundongos submetidos à inoculação da peçonha da serpente *B. leucurus*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Protocolo experimental

A metodologia (Figura 4) do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (protocolo No 026/20). Para seu desenvolvimento, utilizou-se 112 camundongos machos com peso entre 25 e 30 gramas, oriundos do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da UESC, que foram mantidos em gaiolas coletivas (sete animais cada) com comida e água *ad libitum*, sob temperatura controlada de aproximadamente 23°C e ciclos de luz alternados de 12 em 12 horas (12 horas de luz, 12 horas de escuro).

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais com base nos tratamentos realizados, cada um composto por 28 animais, a saber: laser vermelho (GV), laser infravermelho (GI), laser vermelho e infravermelho associados (GVI) e controle (GC). Os grupos foram distribuídos em quatro subgrupos (cada um com sete animais) submetidos a diferentes tempos de tratamentos (24, 48, 72 e 144 horas).

Foi utilizada a peçonha bruta liofilizada de *B. leucurus*, cuja massa foi aferida em uma balança analítica e o produto foi diluído em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% estéril para alcance da dose de 0,6 mg/kg no volume de 50 µl (FERNANDES et al. 2020). Realizou-se a tricotomia da pele da região onde o músculo gastrocnêmio se localiza, seguida da higienização com Clorexidina degermante antes da aplicação intramuscular. A inoculação da peçonha foi feita no músculo gastrocnêmio direito de todos os animais.

Trinta minutos após a inoculação da peçonha iniciou-se a aplicação do laser. Foi utilizado o laser diodo com potência de 100 mW, emissão contínua (CW), spot de 0,1cm², comprimento de onda de 660 nm (vermelho) e 808 nm (infravermelho). A mesma densidade energética foi estabelecida para todos os grupos tratados (Tabela 4). Os animais foram contidos manualmente durante a aplicação do laser e a luz direcionada à área do músculo gastrocnêmio onde a peçonha foi inoculada. A técnica de aplicação foi padronizada para todos os grupos e o grupo controle foi submetido ao laser desligado (BARBOSA et al., 2010). O intervalo de 24 horas entre as aplicações foi estabelecido com o intuito de evitar efeitos cumulativos ao longo do tratamento (RIEGEL & GODBOLD, 2017).

A eutanásia foi realizada 24 horas após a última aplicação do laser em todos os subgrupos mediante a técnica de aprofundamento anestésico. Para tanto, foram utilizados Cetamina (180 mg/Kg) e Xilazina (30 mg/Kg), administrados pela via intraperitoneal.

Tabela 4- Protocolo terapêutico aplicado nos diferentes grupos de tratamento

Comprimento de onda	Energia/ponto	Tempo (s)	Densidade energética (DE)	Número de pontos	Potência do aparelho	Área do spot	Densidade de potência (DP)
GC	NSA	10	NSA	1	NSA	NSA	NSA
GV	1 J	10	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²
GI	1 J	10	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²
GVI	0,5 + 0,5	5	10J/cm ²	1	100 mw	0,1cm ²	1W/cm ²

*NSA: Não se aplica.

6.2.2 Coleta das amostras

Os músculos gastrocnêmios submetidos à inoculação da peçonha foram dissecados e coletados imediatamente após a eutanásia e subsequentemente foram acondicionados em recipientes com formaldeído a 10% tamponado por 24-48 horas para fixação, seguindo-se o processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram cortados com auxílio do micrótomo semiautomático para obtenção de cortes histológicos de 4-5 µm que foram posteriormente corados (PICULO et al., 2014).

6.2.3 Análise histomorfométrica

As lâminas histológicas produzidas foram coradas pela técnica de rotina de Hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas por meio da microscopia de luz (SOUSA, 2012). Essa coloração permitiu a avaliação qualitativa dos aspectos gerais dos tecidos, destacando-se as características referentes ao tipo (polimorfonuclear, mononuclear, misto) e distribuição do infiltrado inflamatório e da hemorragia, a qual foi classificada como discreta, moderada ou intensa de acordo com a quantidade e distribuição das hemácias (Quadro 1). Além disso, para avaliação quantitativa do processo inflamatório, 10 campos aleatórios de cada lâmina foram fotografados com auxílio do fotomicroscópio DM 2500 (Leica ®) no aumento de 40x e as células inflamatórias foram contabilizadas por meio do software ImageJ utilizando-se o plugin *cell conter* (SANTOS et al., 2014).

Quadro 1 – Classificação do grau de hemorragia

Discreto (+)	Hemácias isoladas ou em pequenos grupos, ausentes em mais de 70% da lâmina

Moderado (++)	Hemácias distribuídas em múltiplos grupos, observadas entre 30 e 70% da lâmina
Intenso (+++)	Hemácias distribuídas em grupos densos ou difusamente, observadas em mais de 70% da lâmina

Em adição a isso, as lâminas histológicas foram submetidas também à coloração de *Pricosirius red* com a finalidade de avaliar a formação de colágeno nos diferentes tempos de tratamento (BEDOYA et. al., 2016). As lâminas foram submetidas à análise morfométrica para mensuração da área de colágeno neoformado durante o reparo tecidual. Para tanto, foram fotografados 10 campos de cada lâmina, os quais foram selecionados aleatoriamente no aumento de 20x utilizando o fotomicroscópio DM 2500 (Leica ®). As imagens foram convertidas no software ImageJ do tipo *RBG color* para *RBG stack* e posteriormente ajustadas por meio da ferramenta *Threshold*, cujo valor foi padronizado de acordo com os subgrupos (variação de 0-40 a 0-100) (SCHIPKE et al., 2017). O método de avaliação adotado foi o cego com um mesmo pesquisador responsável por todas as avaliações (OLIVEIRA, 2019).

6.2.4 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para averiguação dos parâmetros de normalidade, para cada par de grupo/tempo por grupo foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-whitney (_ post hoc _). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e incluída a correção de Bonferroni para os testes _ post hoc _. O teste qui-quadrado foi utilizado para avaliação das variáveis hemorragia e tipo de infiltrado inflamatório e foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

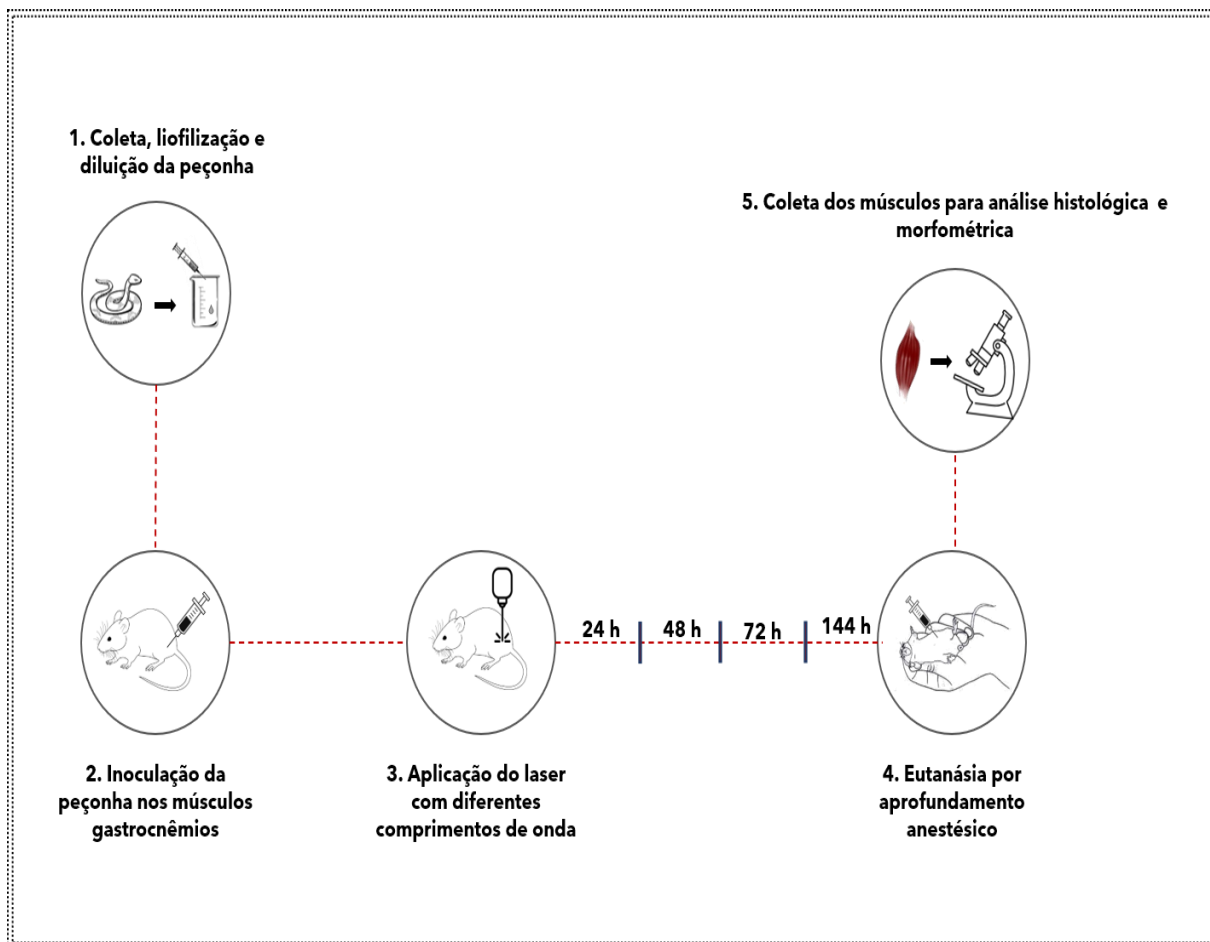


Figura 8 - Resumo das atividades experimentais desenvolvidas. 1. A peçonha bruta da serpente *B. leucurus* foi diluída em solução salina a 0,9%. 2. Foram inoculados 50 µl de peçonha no músculo gastrocnêmio direito (0,6 mg/kg). 3. Aplicação do laser (técnica pontual) com DE de 10J/cm² em todos os animais independente do comprimento de onda utilizado. 4. Realização da eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. 6. Coleta dos músculos gastrocnêmios para análise histomorfológica.

6.3 RESULTADOS

Foram observadas alterações histopatológicas em todos os grupos experimentais como consequência da inoculação da peçonha botrópica e os resultados referentes ao tempo de 24 horas foram os mais expressivos. De modo geral, as lesões mais frequentes foram hemorragia; mionecrose; inflamação (predominância de neutrófilos 24 e 48 horas após a inoculação da peçonha) e edema intersticial (Figura 5). Adicionalmente, no tempo de 144 horas foram observadas células satélites em indivíduos de todos os grupos tratados.

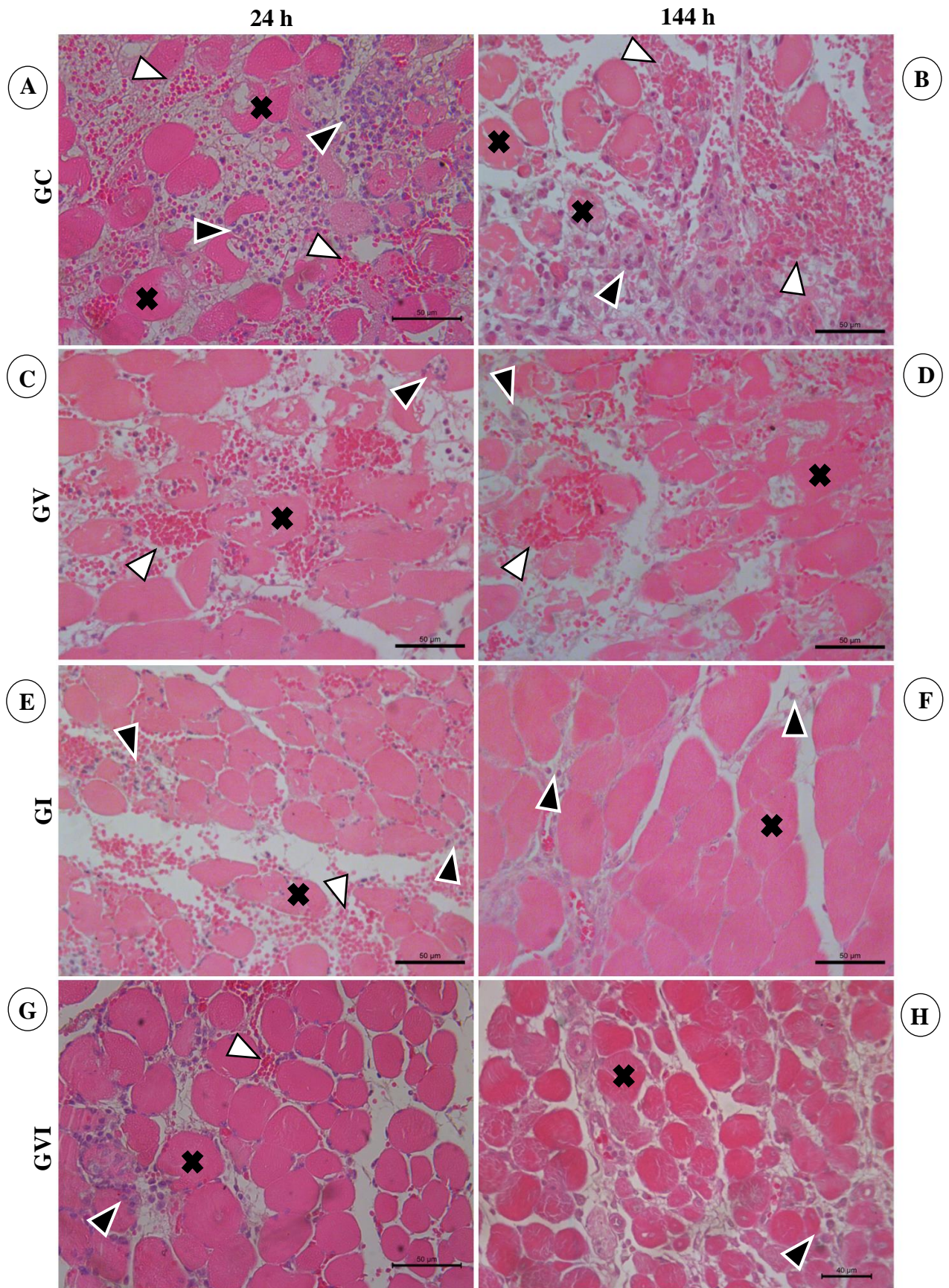


Figura 9 - Lesões histopatológicas observadas nos diferentes grupos nos tempos de 24 e 144 horas. Fragmentos de músculo gastrocnêmio submetidos à inoculação da peçonha de *B. leucurus* corados em H.E (40x). A -B: Não tratados. C-D: Tratados com laser vermelho (660 nm). E-F: Tratados com laser

infravermelho (808 nm). G-H: Tratados com laser vermelho + Infravermelho. Seta branca: Áreas de hemorragia. Seta preta: Células inflamatórias. X: Fibras musculares necróticas. GC: grupo controle, GV: grupo vermelho, GI: grupo infravermelho, GVI: grupo vermelho + infra.

Todos os grupos tratados diferiam do controle em relação à intensidade da inflamação e no GVI houve redução significativa quando comparado ao GV e GI. Quanto aos tempos de tratamento, no GC não houve redução significativa do processo inflamatório durante o período avaliado, ao passo que em todos os grupos tratados observou-se diminuição progressiva da inflamação a partir da segunda aplicação do laser, com exceção do GVI, que foi o único grupo em que se notou diferença também entre os tempos de 24 e 48 horas (uma e duas aplicações do laser, respectivamente) (Tabela 5). No GV e GVI, o tempo de 72 horas (três aplicações do laser) demonstrou maior significância e em todos os grupos tratados houve redução da intensidade da inflamação 144 horas após a inoculação da peçonha (Figura 10A-E).

Em adição, destaca-se que em todos os tempos de avaliação os grupos tratados apresentaram uma quantidade de células inflamatórias significativamente menor quando comparados ao grupo controle e no GVI a inflamação foi atenuada de forma mais significativamente em todos os tempos de tratamento em relação ao GV e ao GI (Figura 10F).

Tabela 5- Intensidade da inflamação: Comparação entre os diferentes tempos de tratamento.

GC	Média	Mediana	Diferença
24 – a	236,18	232,90	Ns
48 – b	233,45	223,90	Ns
72 – c	216,38	215,15	Ns
144 – d	175,48	190,85	Ns
GV	Média	Mediana	
24 – a	129,33	131,10	c,d
48 – b	123,93	124,10	c,d
72 – c	65,36	63,50	a,b,d
144 – d	47,42	48,75	a,b,c
GI	Média	Mediana	
24 – a	129,28	132,00	D
48 – b	118,20	117,82	c,d
72 – c	85,84	87,82	b,d
144 – d	58,15	58,85	a,b,c
GVI	Média	Mediana	
24 – a	94,82	94,90	b,c,d
48 – b	71,06	73,30	a,c,d
72 – c	37,52	36,70	a,b,d
144 – d	17,63	15,50	a,b,c

Na coluna das diferenças, as letras indicam os tempos de tratamento que diferem significativamente ($p < 0,05$) do tempo em evidência em cada linha, de modo que, “a” corresponde ao tempo de 24 horas, “b” 48 horas, “c” 72 horas e “d” 144 horas.

Observou-se ainda diferença entre os grupos quanto ao tipo de infiltrado inflamatório, de forma que o GVI apresentou o menor percentual de células polimorfonucleares e foi também o grupo em que se observou maior quantidade de células mononucleares. Ademais, todos os grupos tratados demonstraram maior percentual de células mononucleares no infiltrado quando comparados ao GC. Em conjunto, os resultados indicam que há associação entre o comprimento de onda utilizado e o tipo de infiltrado inflamatório observado (Tabela 6).

Tabela 6 – Tipo de infiltrado inflamatório predominante nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Tipo de Infiltrado (%)			
	Polimorfo	Misto/Poli	Misto/Mono	Mono
Controle (GC)	58,4	16,6	12,5	12,5
Vermelho (GV)	57,7	19,2	0	23,1
Infra (GI)	58,3	16,7	0	25
Vermelho + Infra (GVI)	42,3	11,5	15,4	30,8

$$X^2 = 49,1 \text{ e } p = 0,006.$$

Os tempos de tratamento também foram significativamente diferentes em relação ao tipo celular predominante em todos os grupos, o que torna evidente a associação existente entre o tipo celular predominante no infiltrado inflamatório e o tempo de tratamento (Tabela 7). Após 144 horas, o infiltrado inflamatório foi classificado como mononuclear em 100% dos indivíduos tratados e em somente 50% do GC. Além disso, o GVI foi o primeiro grupo em que se observou a sobreposição de células mononucleares em relação às polimorfonucleares e, de modo geral, apresentou o percentual de mononuclear mais expressivo em relação aos demais.

Tabela 7 – Tipo de infiltrado inflamatório predominante nos diferentes tempos de tratamento

Tempo	Tipo de infiltrado inflamatório (%)				X ²	P
	Polimorfo	Misto/Poli	Misto/Mono	Mono		
GC						
24 h	100,00	0,00	0,00	0,00	42,50	<0,001
48 h	100,00	0,00	0,00	0,00		
72 h	33,40	66,60	0,00	0,00		
144 h	0,00	0,00	50,00	50,00		
GV						
24 h	100,00	0,00	0,00	0,00	41,10	<0,001
48 h	100,00	0,00	0,00	0,00		
72 h	28,60	71,40	0,00	0,00		
144 h	0,00	0,00	0,00	100,00		
GI						
24 h	100,00	0,00	0,00	0,00	41,90	<0,001
48 h	83,40	16,70	0,00	0,00		
72 h	50,00	50,00	0,00	0,00		
144 h	0,00	0,00	0,00	100,00		
GVI						
24 h	100,00	0,00	0,00	0,00	54,90	<0,001
48 h	71,40	28,60	0,00	0,00		
72 h	0,00	16,70	66,70	16,60		
144 h	0,00	0,00	0,00	100,00		

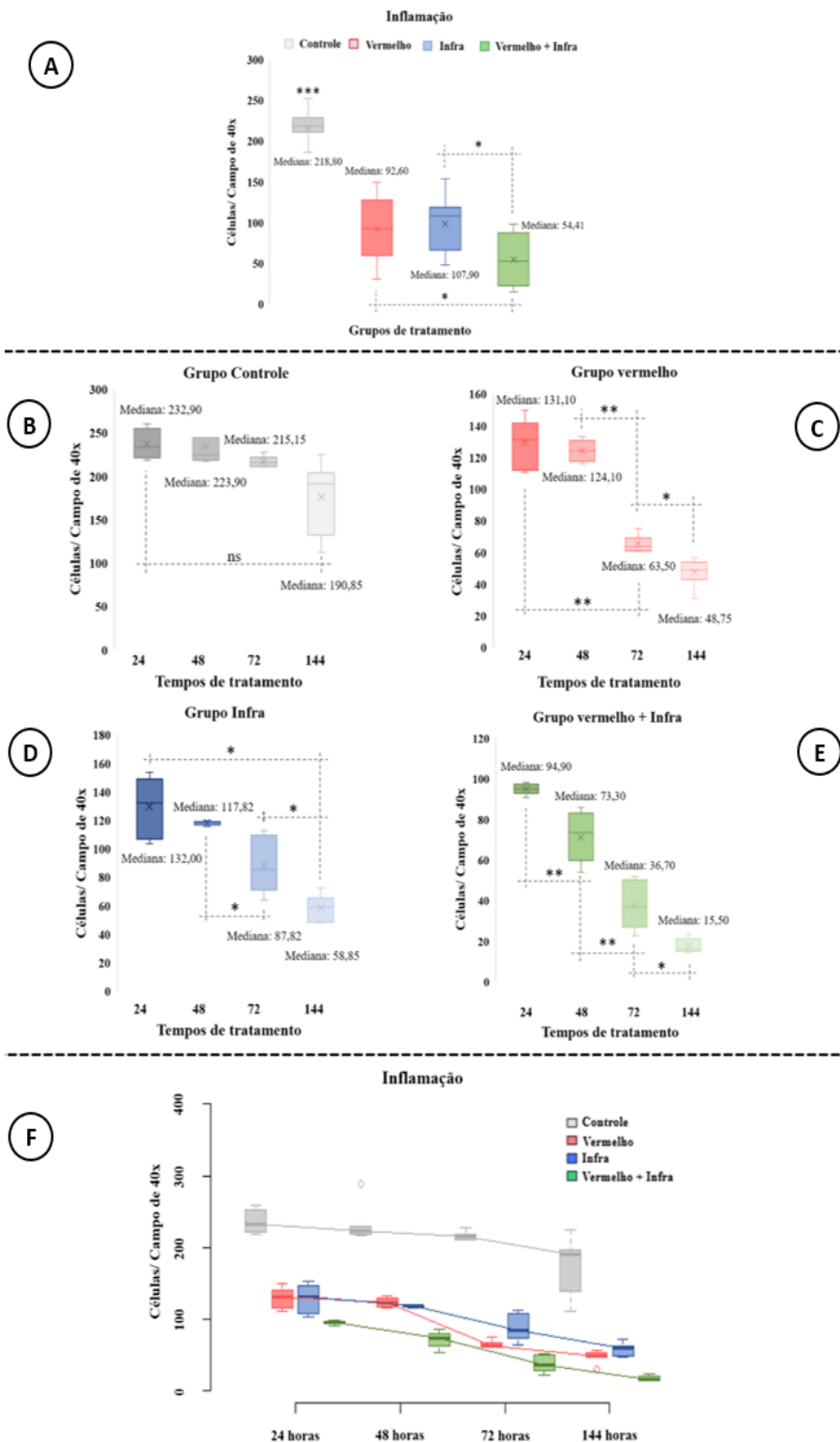


Figura 10 - Intensidade da inflamação. A: Comparações entre os diferentes grupos experimentais: GV x GC (U = 14,00 e p < 0,001), GI x GC (U = 14,00 e p < 0,001), GVI x GC (U = 0,00 e p < 0,001), GVI x GV (U = 159 e p = 0,0492), GI x GVI (U = 109 e p = 0,0157). A: Diferença entre todos os grupos tratados e o controle. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, (***) p < 0,001. B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Sem diferença significativa. (ns) não significativo. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Diferença significativa entre os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01. D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Diferença entre

os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) $p < 0,05$. E: entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho e infra (GVI). Diferença entre todos os tempos de tratamento. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

Houve associação significativa entre a intensidade da hemorragia e o tipo de tratamento realizado, de maneira que essa alteração foi classificada como ausente ou discreta em maior percentual de animais nos grupos tratados quando comparados ao GC. Em adição, o GC demonstrou o maior índice de hemorragia intensa entre os grupos experimentais e o GVI teve a maioria de seus indivíduos com hemorragia classificada como discreta, além de apresentar a maior quantidade de animais com ausência da alteração. Em conjunto, esses resultados sugerem que houve uma associação significativa entre o tipo de tratamento e a intensidade da hemorragia (Tabela 8).

Tabela 8 – Intensidade da hemorragia nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Hemorragia (%)			
	Ausente	Discreta	Moderada	Intensa
GC	7,10	14,30	25,00	53,60
GV	17,90	25,00	53,60	3,60
GI	17,90	28,60	50,00	3,60
GVI	22,20	40,70	37,00	0,00

$$X^2 = 45,1 \text{ e } p < 0,001.$$

Vale salientar que a comparação entre os diferentes tempos evidenciou redução progressiva da hemorragia local e associação estatisticamente significativa entre o tempo de tratamento e a intensidade da hemorragia (Tabela 9).

Tabela 9 – Intensidade da hemorragia nos diferentes tempos de tratamento.

Tempo	Hemorragia (%)			
	Ausente	Discreta	Moderada	Intensa
24 h	0,00	7,10	60,70	32,10
48 h	3,60	28,60	46,40	21,40
72 h	3,70	33,30	55,60	7,40
144 h	57,10	39,30	3,60	0,00

$$X^2 = 69,8 \text{ e } p < 0,001.$$

Observou-se deposição de colágeno no tecido muscular em todos os grupos submetidos à inoculação da peçonha botrópica (Figura 6) e a quantidade observada se tornou progressivamente maior de modo que, 144 horas após a inoculação (seis aplicações do laser), foram registradas as maiores áreas de deposição de colágeno.

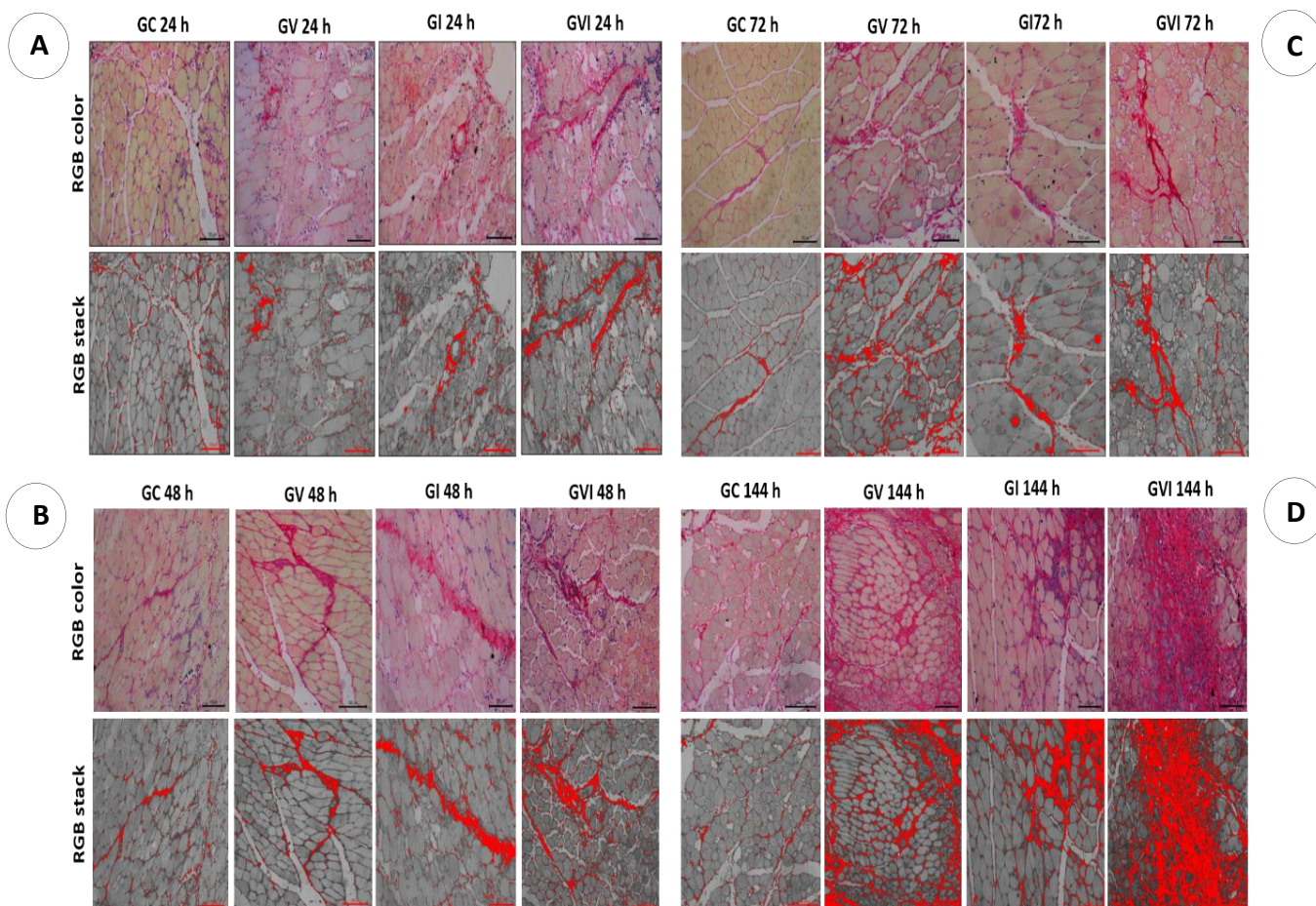


Figura 11 – Deposição de colágeno ao longo do tempo. Fragmentos de músculo gastrocnêmio submetidos à inoculação da peçonha de *B. leucurus* corados em *Picrosirius red* (20x). A: Todos os grupos no tempo de 24 horas. C: Todos os grupos no tempo de 72 horas. B: Todos os grupos no tempo de 48 horas. D: Todos os grupos no tempo de 144 horas. RGB color: Imagem original. RGB stack: escala de cinza. GC: grupo controle, GV: grupo vermelho, GI: grupo infravermelho, GVI: grupo vermelho + infra.

A deposição de colágeno foi significativamente maior nos grupos tratados com o comprimento de onda vermelho (GV) e com ambos comprimentos associados (GVI) quando comparados ao controle (GC). Além disso, a deposição de colágeno foi superior no GVI quando comparado ao GI (Figura 12A). Ademais, no GV e no GVI houve aumento progressivo da deposição de colágeno (Figura 12C e E) e no GI não houve diferença significativa entre os tempos de tratamento (Figura 12D). Todos os grupos tratados apresentaram maior deposição colágena quando comparados ao grupo não tratado 24 horas a inoculação da peçonha, além disso, entre os tratados a quantidade de colágeno foi significativamente maior no GVI em relação ao GV e ao GI.

Em adição, 48 horas após a inoculação a área de colágeno foi significativamente maior nos grupos tratados em relação ao controle e 72 horas depois da inoculação o GV e o GVI

apresentaram deposição colágena significativamente maior que o GC e no GI a área de colágeno foi significativamente menor quando comparado ao GVI. Além disso, 144 horas após a inoculação o GVI diferiu do GC e dos demais grupos tratados, apresentando a maior deposição de colágeno observada nesse tempo.

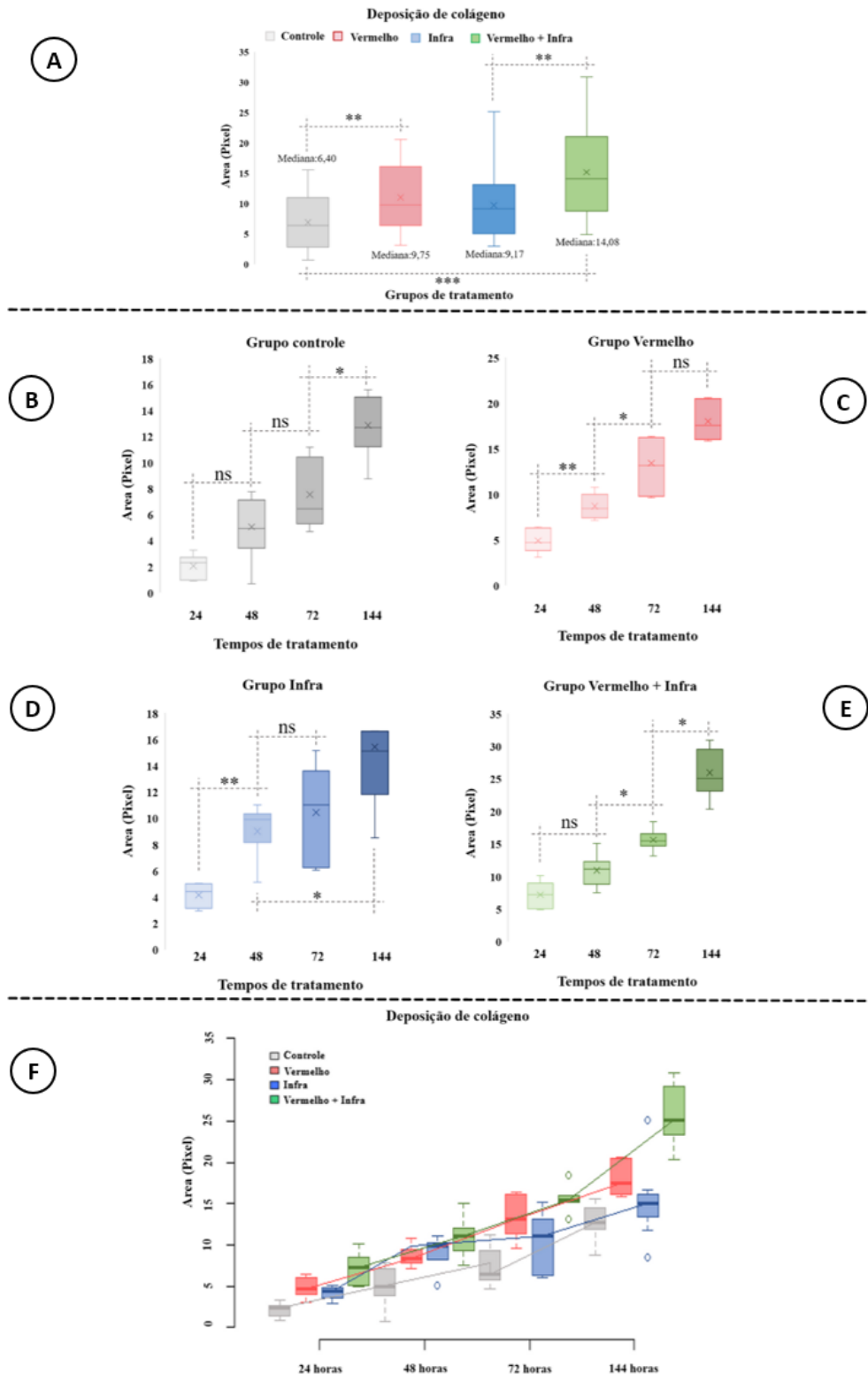


Figura 12 - Deposição de colágeno: Comparações entre os diferentes grupos experimentais. A: Vermelho x controle (U = 207,00 e p = 0,004), vermelho + infra x controle (U = 125 e p < 0,001), infra x vermelho + infra (U = 199 e p = 0,007). (***) p < 0,01, (***) p < 0,001, (ns) não significativo. B: Comparações entre os diferentes tempos de avaliação do grupo não tratado (GC). Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas. (*) p < 0,05. C: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho (GV). Diferença significativa entre todos os tempos de tratamento, exceto entre 72 e 144 horas (*) p < 0,05, (**) p < 0,01. D: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser infravermelho (GI). Diferença significativa entre os tempos de 24 e 144 horas. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01. E: Comparações entre os diferentes tempos de tratamento com o laser vermelho + infra (GVI). Diferença significativa entre todos os tempos de tratamento a partir de 48 horas. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, (ns) não significativo.

Além disso, no GC 24 horas após a inoculação da peçonha a deposição colágena foi significativamente menor quando comparada à observada no subgrupo tratado até 144 horas após a inoculação da peçonha (Figura 12B). No GV registrou-se maior deposição de colágeno nos subgrupos tratados por 48 e 72 horas após a inoculação da peçonha quando comparados ao avaliado 24 horas após a inoculação da peçonha. No GVI houve aumento progressivo dos valores referentes à área de colágeno nos subgrupos avaliados 48, 72 e 144 horas após a inoculação da peçonha (Figura 12E e Tabela 10).

Tabela 10- Deposição de colágeno: comparação entre os diferentes tempos de tratamento.

GC	Média	Mediana	Diferenças
24 – a	2,05	2,32	c,d
48 – b	5,04	4,94	D
72 – c	7,53	6,44	D
144 – d	12,85	12,67	a,b,c
GV	Média	Mediana	
24 – a	4,91	4,70	b,c,d
48 – b	8,70	8,42	a,c,d
72 – c	13,42	13,14	a,b
144 – d	17,99	17,52	a,b
GI	Média	Mediana	
24 – a	4,14	4,40	b,c,d
48 – b	8,89	9,98	a,d
72 – c	10,44	11,02	A
144 – d	15,42	15,10	a,b
GVI	Média	Mediana	
24 – a	7,16	7,2	c,d
48 – b	10,92	11,14	c,d
72 – c	15,59	15,42	a,b,d
144 – d	25,93	25,07	a,b,c

Na coluna das diferenças, as letras indicam os tempos de tratamento que diferem significativamente ($p < 0,05$) do tempo em evidência em cada linha, de modo que, “a” corresponde ao tempo de 24 horas, “b” 48 horas, “c” 72 horas e “d” 144 horas.

6.4 DISCUSSÃO

A fotobiomodulação reduziu a inflamação e a hemorragia no presente estudo e estimulou a deposição de colágeno no tecido muscular, além disso, a quantidade de células inflamatórias e o grau da hemorragia foram menores no grupo tratado com os comprimentos de onda associados. Quanto aos efeitos da peçonha da serpente *B. leucurus*, sabe-se que seus componentes predominantes são as fosfolipases A2, metaloproteases e serino-proteases (BRAGA et al., 2020), que são as principais moléculas bioativas responsáveis pela mionecrose, inflamação, hemorragia e edema observados como consequência dos acidentes botrópicos (D’AMÉLIO et al., 2021). Desse modo, as alterações histopatológicas descritas nos animais do presente estudo resultam principalmente da ação conjunta desses componentes sobre o tecido muscular. As lesões locais observadas em vítimas de acidentes ofídicos apresentam prazo de recuperação médio a longo de modo que, mesmo em casos leves, esse processo pode se estender de semanas a meses (WAIDDYANATHA et al., 2019). Quando submetido à fotobiomodulação, embora haja redução progressiva dos danos, o músculo inoculado com a peçonha botrópica apresenta inflamação, hemorragia e mionecrose por mais de sete dias (DOURADO et al., 2017), o que concorda com a observação dessas alterações em todos os subgrupos no presente estudo.

Todos os tratamentos com laser reduziram a intensidade da resposta inflamatória no tecido muscular em relação ao controle e os efeitos das luzes visível (vermelha) e invisível (infravermelha) aplicadas individualmente foram semelhantes. Sabe-se que o influxo de leucócitos é significativamente reduzido pelo comprimento de onda vermelho no músculo submetido à inoculação da peçonha botrópica (BARBOSA et al., 2008) e que a luz laser infravermelha também promove redução significativa da resposta inflamatória (DOURADO et al., 2003). Em adição a isso, Lauria et al. (2021) demonstraram efetividade de ambos os comprimentos de onda no tratamento da inflamação muscular causada especificamente pela peçonha de *B. leucurus*. Todavia, esses autores não identificaram diferença significativa entre os efeitos desses dois comprimentos de onda, o que está de acordo com os resultados demonstrados.

De modo geral, a resposta anti-inflamatória é um dos efeitos mais expressivos da fotobiomodulação e ele se deve à combinação de diversos mecanismos, dentre os quais se destaca a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em situações de estresse oxidativo, o que reduz a interação entre tais moléculas e o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e, por consequência, a liberação de citocinas pró-inflamatórias (HAMBLIN, 2017). Em adição, os comprimentos de onda vermelho e infravermelho são capazes de reduzir a expressão de prostaglandina E2 (PGE2) e das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2), o que também contribui para a atenuação da resposta inflamatória local (FREITAS & HAMBLIM, 2016).

No presente estudo a luz laser influenciou a composição do infiltrado inflamatório, de modo que, nos grupos tratados notou-se aumento de células mononucleares em relação ao grupo não tratado, o que evidencia a influência do tratamento sobre a mudança do tipo celular predominante ao longo do tempo de tratamento. A fotobiomodulação é capaz de induzir a ativação de macrófagos em tecidos submetidos à ação da peçonha botrópica (REIS et al., 2021^a). Além disso, Dourado et al. (2003) observaram no tecido inoculado com a peçonha botrópica infiltrado inflamatório misto com maior quantidade de macrófagos nos indivíduos irradiados com a luz laser. Acredita-se que o aumento do recrutamento e ativação de macrófagos acelera o reparo tecidual, à medida que intensifica a remoção dos componentes celulares danificados e viabiliza a resolução do processo inflamatório (REIS et al., 2021^b).

As células satélites observadas no último tempo de avaliação nos grupos tratados indicam regeneração em curso das fibras musculares, visto que esse tipo celular estimula a diferenciação e proliferação de células miogênicas, o que favorece a reestruturação do tecido (YIN et al., 2013). Quanto aos efeitos da fotobiomodulação no envenenamento botrópico, Lauria et al. (2021) demonstram que os comprimentos de onda vermelho e infravermelho são capazes de ativar essas células e intensificar a diferenciação miogênica, o que explica a presença desse tipo celular nos grupos tratados do presente estudo. Em adição a isso, a visualização de hemácias no interior de vasos neoformados no GVI evidencia a estimulação à angiogênese exercida pela fotobiomodulação, o que se associa à eficiência do reparo tecidual (NASCIMENTO et al., 2021).

A redução da hemorragia local como efeito da aplicação do laser também foi observada por Nadur-Andrade et al. (2012) como efeito do comprimento vermelho e por Dourado et al. (2003) mediante a utilização do laser infravermelho. Ademais, Franco et al. (2016) demonstraram que ambos os comprimentos de onda exercem atividade citoprotetora sobre

células endoteliais submetidas aos efeitos da peçonha botrópica, o que justifica a redução dessa alteração como resultado do tratamento com laser. Vale salientar que a fotobiomodulação é considerada eficaz em relação à modulação de alterações endoteliais de modo geral, o que influencia indiretamente a resolução de processos inflamatórios (COLOMBO et al., 2021), de modo que se pode sugerir a existência de uma interação entre essas variáveis no presente estudo.

A fotobiomodulação demonstrou efetividade em relação à deposição de colágeno quando considerados o comprimento de onda vermelho e a associação entre o vermelho e o infravermelho. O colágeno é indispensável para a manutenção da integridade do músculo esquelético, de modo que o aumento de colágeno tipo I, III e IV é notado frequentemente como resultado de eventos que perturbam sua conformação morfofuncional (NAKAYAMA et al., 2019). Durante o reparo tecidual, a deposição de colágeno é observada de forma mais expressiva a partir de 72-96 horas após o estabelecimento da lesão e pode se manter por até duas a três semanas (CAMPOS et al., 2007), o que justifica a diferença observada no GC apenas entre 24 e 72 horas e 24 e 144 horas. Em contrapartida, no GV e GVI também foi identificada diferença entre os tempos de 24 e 48 horas e 48 e 72 horas, o que indica aceleração da deposição de colágeno como resultado dos efeitos dos comprimentos de onda.

A luz laser intensifica a deposição de colágeno em tecidos lesados e um dos principais mecanismos relacionados a isso é o estímulo à liberação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (FREITAS & HAMBLIM, 2016). Tais efeitos são frequentemente observados em lesões do sistema locomotor de modo que, nessas situações específicas, a luz laser promove o aumento da produção desses mediadores, o que leva à maior deposição de colágeno do tipo I e III no tecido lesionado (MARQUES et al., 2016). Sendo assim, sugere-se que a diferença observada entre o GC e GV e entre o GC e GVI pode estar associada ao aumento da liberação de fatores de crescimento que aceleram e intensificam o reparo tecidual. Quanto ao grupo tratado com o comprimento de onda infravermelho, sugere-se que em um maior período de avaliação resultados positivos possam ser observados, uma vez que Lauria et al. (2021) demonstraram que, embora a luz laser vermelha e a infravermelha tenham sido efetivas no tratamento das alterações histopatológicas causadas pela peçonha de *B. leucurus*, os resultados do comprimento visível (vermelho) foram observados mais rapidamente.

Os efeitos da associação entre os comprimentos de onda foram mais expressivos em relação aos efeitos dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho utilizados de forma

isolada em relação à redução das variáveis inflamação e hemorragia e no GVI a deposição de colágeno foi significativamente maior que a registrada no GI. Embora os mecanismos envolvidos na atuação dos comprimentos associados ainda não sejam claros, sabe-se que no tratamento de feridas cutâneas tal interação é positiva e resulta no estímulo à deposição de colágeno, angiogênese e controle da dor (LIMA et al., 2014). Além disso, Santos et al. (2011) demonstraram que feridas cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus* responderam melhor ao tratamento com os dois comprimentos de onda quando comparados ao uso isolado de ambos. Marinho et al. (2013), por sua vez, demonstraram maior índice de deposição de colágeno e menor intensidade da resposta inflamatória como resposta ao tratamento de laringite com os comprimentos associados em comparação ao uso individual.

6.5 CONCLUSÃO

A fotobiomodulação se mostrou eficaz no tratamento da inflamação e hemorragia ocasionadas pela peçonha da serpente *B. leucurus* e estimulou a deposição de colágeno durante o reparo tecidual, além de acelerar a modificação do infiltrado inflamatório, antecipando a aparição de células polimorfonucleares em relação ao controle. A associação entre os comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho (808) se mostrou mais eficaz em relação à redução da inflamação e hemorragia quando comparada ao demais tratamentos e foi melhor em relação à luz laser infravermelha quanto à deposição de colágeno.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho são os primeiros referentes à associação entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho no tratamento de lesões ocasionadas pela peçonha botrópica uma vez que, até então, as discussões estabelecidas nesse sentido baseavam-se na utilização isolada de um ou outro comprimento de onda. Nesse contexto, fica demonstrada a eficiência da interação entre a luz laser vermelha e a infravermelha no tratamento das alterações locais causadas pela peçonha de *B leucurus*, evidenciada no presente estudo pela redução da intensidade inflamatória e da hemorragia, aumento da deposição colágena e melhora da condição clínica dos animais tratados. Em adição, destaca-se que, quando comparada à utilização dos comprimentos de onda isoladamente, a associação entre a luz laser vermelha e infravermelha culminou com efeitos mais expressivos em relação a maioria das variáveis estudadas.

Sendo assim, acredita-se que esse estudo pode contribuir para compreensão dos efeitos dos diferentes comprimentos de onda e sua interação no manejo das alterações clínicas e patológicas associados a acidentes botrópicos. Além disso, as informações aqui discutidas dão espaço ao desenvolvimento de novos estudos, visto que é evidente a necessidade do aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade dos comprimentos de onda visível e invisível associados para melhor entendimento das respostas observadas clinicamente e também nos tecidos.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; ASTER, J. C. Chapter 3 - Inflammation and repair. (Ed. 10). **Robbins & Cotran: Pathologic basis of disease**, Filadélfia: ELSEVIER, 2020, p. 103-113.
- ABOU-KHALIL, R.; LE GRAND, F.; PALLAFACCHINA, G.; VALABLE, S.; AUTHIER, F. J.; RUDNICKI, M. A.; GHERARDI, R. K.; GERMAIN, S.; CHRETIEN, F.; SOTIROPOULOS, A.; LAFUSTE, P.; MONTARRAS, D.; CHAZAUD, B. Autocrine and paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 signalling promotes muscle satellite cell self-renewal. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 298–309, 2009. DOI: 10.1016 / j.stem.2009.06.001.
- ALANGODE, A.; RAJAN, K.; NAIR, B. G. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 181, n. 1, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114135.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; PAIVA, J. H. H. G. L.; MARTINS, A. M. C.; MENESES, G. C.; JÚNIOR, G. B. S.; BUCKLEY, N.; DAHER, E. F. Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. 1, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0076.
- ALVES, M. L. M.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; WITT, A. A. Reproductive biological aspects of *Bothrops jararaca* in captivity (Serpentes, Viperidae). **Iheringia Série Zoologia**, v. 89, n. 1, p. 187-192, 2000. DOI: 10.1590/S0073-47212000000200009.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 949-957, 2009. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2008.12.014.
- ARANDA-SOUZA, M. A.; ROSSATO, F. A.; COSTA, R. A. P.; FIGUEIRA, T. R.; CASTILHO, R. F.; GUARNIERE, M. C.; NUNES, E. S.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; VERSECI, A. E. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, v. 82, n. 1, p. 93-107, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.02.018.
- ARGÔLO, A. J. S. Capítulo 2 – Composição faunística (Ed. 1). **Serpentes dos cacauais do Sudeste da Bahia**, Ilhéus: EDITUS-UESC, 2004, p. 99-109.
- BACH, A. S.; ENJALBERT, S.; COMUNALE, F.; BODIN, S.; VITALE, N.; CHARRASSE, S.; GAUTHIER-ROUVIERE, C. ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates Mammalian Myoblast Fusion through Phospholipase D1 and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Signaling Pathways. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n.1, p. 2412–2424, 2010. DOI: 10.1091 / mbc.E09-12-1063.
- BACHA JÚNIOR, W.; BACHA, L. M. Chapter 8- Muscle (Ed. 2). **Color Atlas of Veterinary Histology**, Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 41-44.
- BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; GUIMARÃES-SOUZA, L.; SOUSA, E. S.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C. M. 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**, v. 10, n. 3, p. 470-479, 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000300014.

BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; GUIMARÃES-SOUZA, L.; SOUSA, E. S.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C. M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 27, n. 4, p. 591-597, 2009.

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**, v. 51, n. 7, p. 1236-1244, 2008. DOI: 10.1089/pho.2008.2296.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v.88, n. 2, p. 189–200, 2006. DOI: 10.1016 / j.biochi.2005.07.008.

BERLING, I.; ISBISTER, G.K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 82-89, 2015. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.09.005.

BERNARDE, P. S. Capítulo 13- A malha-de-sapo (Ed. 1). **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**, São Paulo: AnolisBooks. 2014, p. 1-48.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2009.

BERNARDE, P. S.; ABE, A. S. Food habits of snakes from Espigão do Oeste, Rondônia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 166-173, 2010. DOI: 10.1590/S1676-06032010000100017.

BERTOLINI, G. R. F.; TACIANE, T. S.; CIENA, A. P.; TRINDADE, D. L. Effects of the low level laser over pain and edema in tendon trauma of rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 4, p. 362-366, 2008. DOI: 10.1590/S1517-86922008000400008.

BISNETO, P. F.; KAEFER, I. L. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae) from central and southwestern Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 2, p. 105-113, 2019. DOI: 10.1590/1809-4392201802371.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003. DOI: 10.1590/S0102-311X2003000100002.

BRAGA, J. R. M.; MORAIS-ZANI, K.; PEREIRA, D. D. S.; SANT'ANNA, S. S.; DA COSTA, G.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; VILARINHO, A. R. G.; RODRIGUES, J. L.; ROCHA, M. M. T. Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. **Toxicon**, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.05.028.

BUTZ, H.; RACZ, K.; HUNYADY, L.; PATOCS, A. Crosstalk between TGF-beta signaling and the microRNA machinery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 382–393, 2012. DOI: 10.1016 / j.tips.2012.04.003.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 5158, 2007. DOI: 10.1590/S0102-67202007000100010.

CAVALCANTE, J. S.; ALMEIDA, C. A. S.; CLASEN, M. A.; SILVA, E. L.; BARROS, L. C.; MARINHO, A. D.; ROSSINI, B. C.; MARINO, C. L.; CARVALHO, P. C.; JORGE, R. J. B.; SANTOS, L. D. A fingerprint of plasma proteome alteration after local tissue damage induced by *Bothrops leucurus* snake venom in mice. **Journal of Proteomics**, v. 24, n. 253, p. 104-124, 2021. DOI: 10.1016 / j.jprot.2021.104464.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40 n. 2, p. 516-533, 2011. DOI: 10.1007 / s10439-011-0454-7.

CINTRA, M. F.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO G.; ANGULO 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 32, p. 140-145, 2010. DOI: 10.1073 / pnas.1009128107

CINTRA, M. F.; PIZZO, P.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. **Toxicon**, v. 55, n. 2, p. 590-596, 2009. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2009.10.013.

COLOMBO, E.; SIGNORE, A.; AICARDI, S.; ZEKIY, A.; UTYUZH, A.; BENEDICENTI, S.; AMAROLI, A. Experimental and Clinical Applications of Red and Near-Infrared Photobiomodulation on Endothelial Dysfunction: A Review. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, 1-24, 2021. DOI: 10.3390 / biomedicines9030274.

CUNHA L. E. R. Soros antiofídicos: história, evolução e futuro. **Journal Health NPEPS**, v.2, n. 1, p. 1-4, 2017.

D'AMÉLIO, F.; VIGERELLI, H.; SILVA, A. R. B. P.; KERKIS, I. *Bothrops moojeni* venom and its components – an overview. **Journal of Venom Research**, v. 11, n. 1, p. 26-33, 2021.

DATASUS. **Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil, 2021**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso: 09/01/2022.

DEMONBREUN, A. R.; BIERSMITH, B. H.; NALLY, E. M. Membrane fusion in muscle development and repair. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 45, n.1, p. 48-56, 2015. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.10.026.

DEMONBREUN, A. R.; NALLY, E. M. Muscle cell communication in development and repair. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 37, n.1, p. 7-14, 2017. DOI: 10.1016 / j.coph.2017.03.008.

DOIN-SILVA, R.; BARANAUSKAS, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M. A. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 63–69, 2009. DOI: 10.1111 / j.1751-1097.2008.00397.x.

DOURADO, D. M.; FÁVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Effects of the Ga-As Laser Irradiation on Myonecrosis Caused by *Bothrops Moojeni* Snake Venom. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 352–357, 2003. DOI: 10.1002 / lsm.10237.

DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; ALMEIDA, M. F.; DE PAULA, K. R.; VIEIRA, R. P.; OLIVEIRA, L. V. F.; CARVALHO, P. T. C. The effects of low-level laser on muscle damage

caused by *Bothrops neuwiedi* venom. **Journal of venomous animals and toxins including tropical**, v. 14, n. 3, p. 423-434, 2008. DOI: 10.1590/S1678-91992008000300004.

DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; BARBOSA-FERREIRA, M.; SILVA, B. A. K.; MULLER, J. A. I.; VIEIRA, W. F.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Effects of photobiomodulation therapy on *Bothrops moojeni* snake-envenomed gastrocnemius of mice using enzymatic biomarkers. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1357-1366, 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2252-4.

ERIC, C. K.; GREN, E. C. K.; KITANO, E. S.; ANDRADE-SILVA, D.; IWAI, L. K.; REIS, M. S.; MENEZES, M. C.; SERRANO, S. M. T. Comparative analysis of the high molecular mass subproteomes of eight *Bothrops* snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 30, n. 1, p. 113-121, 2019. DOI: 10.1016/j.cbd.2019.01.012.

FADEEL, B.; XUE, D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, n. 1, p. 264–277, 2009. DOI: 10.1080 / 10409230903193307

FAN, H. W.; VIGILATO, M. A. N.; POMPEI, J. C. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Situación de los laboratorios públicos productores de antivenenos en América Latina. **Pan American Journal of Public Health**, v. 43, n. 1, 2019. DOI: 10.26633/RPSP.2019.92.

FERNANDES, J. O. S.; GOUVEIA, D. M.; DAVID, A. C.; NUNEZ, S. C.; ZAMUNER, S. R.; MAGALHÃES, D. S. F.; NAVARRO, R. S.; COGO, J. C. The use of ozone therapy and photobiomodulation therapy to treat local effects of *Bothrops jararacussu* snake venom. **Research in Biomedical Engineering**, v. 37, n. 3, p. 247-255, 2021. DOI: 10.1590/S0102-36162011000300003

FERNANDES, T. L.; PEDRINELLI, A.; HERNANDEZ, A. J. Lesão muscular: fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e apresentação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 3, p. 247-255, 2011. DOI: 10.1590/S0102-36162011000300003.

FERNÁNDEZ, J.; CACCIN, P.; KOSTER, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M., MONTECUCCO, C.; POSTLE, A. D. Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins – distinct mechanisms of action. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 1, p. 3878-3886, 2013. DOI: 10.1111 / febs.12386.

FLORES, D. V.; GOMÉZ, C. M.; ESTRADA-CASTRILLON. M.; SMITAMAN, E.; PATHRIA, M. N. MR Imaging of muscle trauma: Anatomy, Biomechanics, Pathophysiology, and Imaging Appearance. **Radiographics**, v. 38, n.1, p. 124-148, 2017. DOI: 10.1148 / rg.2018170072.

FRANCO, A. T. B.; SILVA, L. M. G.; COSTA, M. S.; ZAMUNER, S. F.; VIEIRA, R. P.; TEIXEIRA, C. F. P.; ZAMUNER, S. R. Effect of photobiomodulation on endothelial cell exposed to *Bothrops jararaca* venom. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 1, p. 1017-1025, 2016. DOI: 10.1007 / s10103-016-1941-8.

FREDSTED, A.; GISSEL, H.; MADSEN, K.; CLAUSEN, T. Causes of excitation-induced muscle cell damage in isometric contractions: mechanical stress or calcium overload? **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 6, p. 2249-2258, 2007. DOI: 10.1152 / ajpregu.00415.2006.

FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1-17, 2016. DOI: 10.1109 / JSTQE.2016.2561201.

FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 401-410, 2006. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2006.06.005.

GIARETTA, V. M. A.; SANTOS, L. P.; BARBOSA, A. M.; HYSLOP, T.; CORRA, A. P.; GALHAR, D. S.; NICOLAU, D. A.; COGO, J. C. Low-intensity laser therapy improves tetanic contractions in mouse anterior tibialis muscle injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Research on Biomedical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 157-160, 2016.

GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; DE CASTRO, R. A.; TOS, P.; FORNARO, M.; BOUX, E.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. G. Low-power laser biostimulation enhances nerve repair after end-to-side neurotaphy: a double-blind randomized study in the rat median nerve model. **Lasers in Medical Science**, v. 19, n.1, p. 57-65, 2004. DOI: 10.1007/s10103-004-0300-3.

GLASS G. E. Photobiomodulation: A review of the molecular evidence for low level light therapy. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 74, n. 5, p. 1050-1060, 2020. DOI: 10.1016/j.bjps.2020.12.059.

GOUVEIA, V. A.; PISETTE, F. R. F. S.; WAGNER, C. L. R.; DALBONI, M. A.; OLIVEIRA, A. P. L.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Photobiomodulation reduces cell death and cytokine production in C2C12 cells exposed to *Bothrops* venoms. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 5, p. 1047-1054, 2020. DOI: 10.1007/s10103-019-02884-4.

GREMSKI, L. H.; CHAIMB, O. M.; PALUDO, K. S.; SADEB, Y. B.; OTUKID, M.; RICHARDSON, W.; GREMSKIF, E. F.; VEIGA, S. S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n.1, p. 120-134, 2007. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2007.03.002.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; DAVID, J.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, A. D. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n.1, p. 1-21, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.63.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337-371, 2017. DOI: 10.3934 / biophy.2017.3.337.

HE, W. A.; CALORE, F.; LONDHE, P.; CANELLA, A.; GUTTRIDGE, D. C.; CROCE, C. M. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 4525–4529, 2014. DOI: 10.1073 / pnas.1402714111.

HERRERA, M.; GONZALEZ, K.; RODRÍGUEZ, C.; GÓMEZ, A.; SEGURA, A.; VARGAS, M.; VILLALTA, M.; ESTRADA, R.; LEON, G. Active immunization of cattle with a bothropic toxoid does not abrogate envenomation by *Bothrops asper* venom, but increases the likelihood of survival. **Biologicals**, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2016. DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.10.008

HIGUCHI, D. A.; ALMEIDA, M. C.; BARROS, C. C.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, P. R.; LANG, E. A. S.; SAMAAN, M.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. B.; PESQUERO, J. L.

Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 123–129, 2011 DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.05.013.

HORN, A.; MEULEN, J. H. V. D.; DEFOUR, A.; HOGARTH, M.; SEN S.C.; REED, A.; SCHEFFER, L.; CHANDEL, N. S.; JAISWAL J. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. **Science Signaling**, v. 10, n. 494, p. 1-24, 2017. DOI: 10.1126 / scisignal.aaj1978.

JAYAWARDANA, S.; ARAMBEPOLA, C.; CHANG ,T.; GNANATHASAN, A. Long-term health complications following snake envenoming. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 11, n. 1, p. 279-285, 2018. DOI: 10.2147 / JMDH.S126648.

JUBAN, G.; CHAZAUD, B. Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. **FEBS Letters**, v. 591, n. 1, p. 3007-3021, 2017. DOI: 10.1002/1873-3468.12703.

KASTURIRATNE, A.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. Chronic health effects and cost of snakebite. **Toxicon**, v. 9, n.10, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1016/j.toxcx.2021.100074

LAURIA, P. S. S.; MAIA-MARQUES, R.; OLIVEIRA, R.; NUNES, V. L. C.; SILVA, L. L. C. Effects of photobiomodulation therapy on the local experimental envenoming by *Bothrops leucurus* snake. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 214, n. 1, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112087.

LE MOAL, E.; PIALOUX, V.; JUBAN, G.; GROUSSARD, C.; ZOUHAL, H.; CHAZAUD, B.; MOUNIER, R. Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 27, n. 5, p. 276-310, 2017. DOI: 10.1089 / ars.2016.6782.

LIMA F. J. C.; BARBOSA, F. T.; SOUSA-RODRIGUES, C. F. Use alone or in Combination of Red and Infrared Laser in Skin Wounds. **Lasers in Medical Science**, v. 5, n. 2, 51-57, 2014.

LIMA, R. L.; BRAGA, P. V.; PELEGRINI, N. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; STRÜSSMANN, C.; SOUSA, V. R. F. *Bothrops* Snakebites in Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2019. DOI: 10.22456/1679-9216.93268.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T. K. Serpentes de importância médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, p. 7-20, 2009.

LIU, J.; SAUL, D.; BOKER, K.O.; ERNST, J.; LEHMAN, W.; SCHILLING, A. F. Current Methods for Skeletal Muscle Tissue Repair and Regeneration. **BioMed Research International**, v. 16, n.1, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1155/2018/1984879.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A (2) to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520-530, 2012. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2012.02.007.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 4, p. 647-659, 2011.

MACHADO, M.; VWILSON, T. M.; SOUSA, D. E. R.; CÂMARA, A. C. L.; FURLAN, F. H.; MACÊDO, J. T. S. A.; PUPIN, R. C.; LEMOS, R. A. A.; ARMIÊN, A. G.; BARROS, S. V.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, M. B. Fatal lancehead pit viper (*Bothrops* spp.)

envenomation in horses. **Toxicon**, v. 170, n. 1, p. 41-50, 2019. DOI: 10.1016/j.toxicon.2019.09.002.

MAIA-MARQUES, R.; NASCIMENTO, I. M. R.; LAURIA, P. S. S.; SILVA, E. C. P.; SILVA, D. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L. Inflammatory mediators in the pronociceptive effects induced by *Bothrops leucurus* snake venom: The role of biogenic amines, nitric oxide, and eicosanoids. **Toxicology**, v. 448, n. 1, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152649.

MAMEDE, C. C. N.; SIMAMOTO, B. B. S.; PEREIRA, D. F. C.; COSTA, J. O.; RIBEIRO, M. S. M.; OLIVEIRA, F. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. **Toxicon**, v. 187, n. 1, p. 10-18, 2020. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2020.08.016.

MARINHO, R. R.; MATOS, R. M.; SANTOS, J. S.; RIBEIRO, M. A. G.; SMANIOTTO, S.; BARRETO, E. O.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, R. C. P.; ALBUQUERQUE, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 5, n. 121, p. 86-93, 2013. DOI: 10.1016 / j.jphotobiol.2013.02.012.

MARQUES, A. C. F.; ALBERTINI, R.; SERRA, A. J.; SILVA, E. A. P.; OLIVEIRA, V. L. C.; SILVA, L. M.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; CARVALHO, P. T. C. Photobiomodulation therapy on collagen type I and III, vascular endothelial growth factor, and metalloproteinase in experimentally induced tendinopathy in aged rats. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 9, p. 1915-1923, 2016. DOI: 10.1007 / s10103-016-2070-0.

MATOS, R. R.; IGNOTTI, E. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2837-2845, 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020257.31462018.

MAZZI, M. V.; MAGRO, A. J.; AMUI, S. F.; OLIVEIRA, C. Z. O.; TICLI, F. K.; STÁBELI, R. G.; FULY, A. L.; ROSA, J. C.; BRAZ, A. S. K.; FONTES, M. R. M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjuSSuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 1, p. 69-85, 2007. DOI: 10.1016 / j.jmgm.2006.09.010.

MCLEISH, M. J.; KENYON, G. L. Relating Structure to Mechanism in Creatine Kinase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 1–20, 2005. DOI: 10.1080 / 10409230590918577.

MENEZES, T. N.; NAUMANN, G. B.; PEIXOTO, P.; ROUVER, W.; GOMES, H. L.; CAMPOS, F. V.; BORGES, M. H.; SANTOS, R. L.; BISSOLI, N. S.; SANCHEZ, E. F.; FIGUEIREDO, S. G. *Bothrops leucurus* venom induces acute hypotension in rats by means of its phospholipase A2 (bID-PLA2). **Toxicon**, v. 15, n. 185, p. 514, 2020. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.06.007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes de trabalho por animais peçonhentos entre trabalhadores do campo, floresta e águas, Brasil 2007 a 2017. **Boletim epidemiológico**, v. 50, n. 11, p. 1-14, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças tropicais negligenciadas. **Boletim epidemiológico**, Número especial, p. 1-76, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de nº 2.472, 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Diário Oficial da União, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt2472_31_08_2010.html.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Tiempo hasta el tratamiento y gravedad del envenenamiento por mordedura de serpiente en el Brasil. **Pan American Journal of Public Health**, v. 42, n. 28, p. 1-6, 2018. DOI: 10.26633/RPSP.2018.52.

MORAIS, I. C. O.; PEREIRA, G. J. S.; ORZÁEZ, M.; JORGE, R. J. B.; BINCOLETTO, C.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A.; SMALI, S. S.; PÉREZ-PAYA, E.; MARTINS, A. M. C. L-Aminoacid Oxidase from *Bothrops leucurus* Venom Induces Nephrotoxicity via Apoptosis and Necrosis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0132569.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109846.

NADUR-ANDRADE, N.; DALE, C. S.; OLIVEIRA, V. R. S.; TONIOLO, E. F.; FELICIANO, R. S.; SILVA JÚNIOR, J. A. Á.; ZAMUNER, S. R. Analgesic Effect of Photobiomodulation on *Bothrops moojeni* Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1-14, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004998.

NADUR-ANDRADE, N.; DALE, C. S.; SANTOS, A. S.; SOARES, A. M.; LIMA, C. J.; ZAMUNER, S. R. Photobiostimulation reduces edema formation induced in mice by Lys-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops moojeni* venom. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1561 – 1567, 2014. DOI: 10.1039 / c4pp00111g.

NAKAYAMA, K. H.; SHAYAN, M.; HUANG, N. F. Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 5, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1002 / adhm.201801168.

NASCIMENTO, L. S.; JÚNIOR, U. R. C.; BRAGA, J. R. M. Perfil epidemiológico do ofidismo no estado da Bahia – Brasil (2010-2015). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2017.

NASCIMENTO, J. J. A. C.; MACHADO, A. S. D.; DELLA-SANTA, G. M. L.; FERNANDES, D. C.; FERREIRA, M. C. F.; MACHADO, G. A. P. M.; CHAVES, B. C. G.; COSTA, K. B.; ROCHA-VIEIRA, E.; OLIVEIRA, M. X.; GAIAD, T. P.; SANTOS, A. P. Effects of photobiomodulation therapy on functional recovery, angiogenesis and redox status in denervated muscle of rats. **Einsten**, v. 24, n. 19, p. 1-9, 2021. DOI: 10.31744 / einstein_journal / 2021AO6001.

NOGUEIRA, C. C.; ARGÔLO, A. J. S.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J. A.; BARBO, F. E.; BÉRNILS, R. S.; BOLOCHIO, B. E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHOM, M.; BRAZ, H.; BUONONATO, M. A.; CISNEROS, H.; COLLI G. R.; COSTA, H. C.; FRANCO, F. L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R. C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M. S.; MARQUES, O. A. V.; MONTINGELLI, G. G.; PASSOS, P.; PRUDENTE, A. L. C.; RIVAS, G. A.; SANCHEZ, P. M.; SERRANO, F. C.; SILVA, N. J.; STRÜSSMANN, C.; VIEIRA-

ALENCAR, J. P. S.; ZAHER, H.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Atlas de Cobras Brasileiras: Mapas de Ponto-Localidade Verificados para Mitigar a Dificuldade Wallacean em uma Fauna de Cobra Megadiversa. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, n. 1, p. 1-274, 2019. DOI: 10.2994/SAJH-D-19-00120.1.

OLIVEIRA, R. B.; RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Risk factors associated with coagulation abnormalities in *Bothrops* envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 657-663, 2003.

PONCE-SOTO, L. A.; BARROS, J. C.; MARANGONI, S.; HERNANDEZ, S.; DAL BELO, C. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA2 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 150, n. 2, p. 291-297, 2009. DOI: 10.1016 / j.cbpc.2009.05.007.

REIS, V. P.; PALOSCHI, M. V.; REGO, C. M. A.; TAVARES, M. N. M.; BOENO, C. N.; LOPES, J. A.; FERREIRA, A. A. F. E.; SOARES, A. M.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P. Photobiomodulation induces murine macrophages polarization toward M2 phenotype. **Toxicon**, v. 30, n. 198, p. 171-175, 2021. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2021.05.009.

REIS, V. P.; REGO, C. M. A.; SETÚBAL, S. S.; TAVARES, M. N. M.; BOENO, C. N.; FERREIRA, A. A. F. E.; PALOSCHI, M. V.; SOARES, A. M.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P. Effect of light emitting diode photobiomodulation on murine macrophage function after *Bothrops* envenomation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 5, n. 333, p. 1-32, 2021. DOI: 10.1016 / j.cbi.2020.109347.

RIEGEL, R. J.; GODBOLD, J. C. J. Chapter 1 - The history of laser therapy (Ed. 1). **Laser therapy in Veterinary Medicine**, Nova Jersey: Wiley-Blackwell. 2017, p. 3-6.

ROCHKIND, S.; GEUNA, S.; SHAINBERGSHAINBERG, A. Phototherapy and nerve injury: focus on muscle response. **International Review of Neurobiology**, v. 109, n. 1, p. 99-109, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-420045-6.00004-3.

ROLA, P.; DOROSZKO, A.; DERKACZ, A. The Use of Low-Level Energy Laser Radiation in Basic and Clinical Research. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 5, p. 835-842, 2014. DOI: 10.17219 / acem / 37263.

RORIZ, K. R. P. S.; ZAQUEO, K. D.; SETUBAL, S. S.; KATSURAGAWA, T. H.; SILVA, R. R.; FERNANDES, C. F. C.; CARDOSO, L. A. P.; RODRIGUES, M. M. S.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 338-346, 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0489-2017.

SABHA, N.; VOLPATTI, J. R.; GONORAZKY, H.; REIFLER, A.; DAVIDSON, A. E.; LI, X.; ELTAYEB, N. M.; DALL'ARMI, C.; DI PAOLO, G.; BROOKS, S. V. PIK3C2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 3613-3625, 2016.

SAMPAIO, I. L. R.; SANTOS, C. P.; FRANÇA, R. C.; PEDROSA, I. M. M. C.; SOLÉ, M.; FRANÇA, F. G. R. Ecological diversity of a snake assemblage from the Atlantic Forest at the south coast of Paraíba, northeast Brazil. **ZooKeys**, v. 782, n. 2, p. 107-125, 2018. DOI: 10.3897/zookeys.787.26946.

- SANTANA-BLANK, L.; RODRÍGUEZ-SANTANA, E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, K. Theoretic, Experimental, Clinical Bases of the Water Oscillator Hypothesis in Near-Infrared Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28 n. 1, p. 41-52, 2010. DOI: 10.1089 / pho.2009.2647.
- SANTOS, J. A. A.; SOUSA, M. F. A.; SILVA, M. L. V.; JÚNIOR, F. C. A. Histomorphometric evaluation of the effects of the aqueous extract of annatto (norbixin) on wound skin healing in rats. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014. DOI: 10.1590/1983-084x/12120.
- SANTOS, N. R. S.; SOBRINHO, J. B. M.; ALMEIDA, P. F.; RIBEIRO, A. A.; CANGUSSÚ, M. C. T.; SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. B. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 3, p. 177-182, 2011.
- SCHEZARO-RAMOS, R.; COLLAÇO, R. C. O.; RANDAZZO-MOURA, P.; ROCHA, T.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Influence of phospholipasic inhibition on neuromuscular activity of *Bothrops fonsecai* snake venom. **Toxicon**, v. 130, n. 1, p. 35-43, 2017. DOI: 10.1016 / j.toxicon.2017.02.027.
- SCHNEIDER, M. C.; MIN, K.; HAMRICK, P. N.; MONTEBELLO, L. R.; RANIERI, T. M.; MARDINI, L.; CAMARA, V. M.; LUIZ, R. R.; LIESE, B.; VUCKOVIC, M.; MORAES, M. O.; LIMA, N.T. Overview of snakebite in Brazil: Possible drivers and a tool for risk mapping. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009044
- SILVA, L. M. G.; ZAMUNER, L. F.; DAVID, A. C.; SANTOS, S. A. S.; CARVALHO, P. T. C.; ZAMUNER, S. R. Photobiomodulation therapy on bothrops snake venom-induced local pathological effects: A systematic review. **Toxicon**, v. 15, n. 1, p. 23-29, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.07.006.
- SILVA, L. M. G.; SILVA, C. A. A.; SILVA, A.; VIEIRA, R. P.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-16, 2016. DOI: 10.1371 / journal.pone.0152890.
- SOUZA A. S.; SACHETT, J. A. G.; ALCÂNTARA, J. A.; FREIRE, M.; ALECRIM, M. G. C.; LACERDA, M.; FERREIRA, L. C. L.; FAN, H. W.; SAMPAIO, V. S.; MONTEIRO, W. M. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, n. 1, p. 15-24, 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.02.041.
- TAULET, N.; COMUNALE, F.; FAVARD, C.; CHARRASSE, S.; BODIN, S.; GAUTHIER-ROUVIERE, C. A associação N-caderina / catenina p120 em contatos célula-célula ocorre em domínios de membrana ricos em colesterol e é necessária para a ativação de RhoA e miogênese. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 23137–23145. DOI: 10.1074 / jbc.M109.017665.
- TEIXEIRA, C.; FERNANDES, C. M.; LEIGUEZ, E.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1, p. 113, 2019. DOI: 10.3389 / fimmu.2019.02082.

TIDBALL, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2029-2062, 2011. DOI: 10.1002 / cphy.c100092.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; MALAFAIA, P.; PEIXOTO, P. V. Snake bite accident in sheep by *Bothrops jararaca*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 643-648, 2008. DOI: 10.1590/S0100-736X2008001200014.

VAZ, V. H. S.; BRAZIL, O. A. V.; PAIXÃO, A. E. A. Intellectual property of antiophidic serum: the effectiveness from the correlation between federal government investments in the main institutes responsible for the production of serum and conducting researches for the treatment of official accidents in Brazil, with regard to the accident of disease acts. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 28, n. 3, p. 409-421, 2020. DOI: 10.1590/1414-462X202028030018.

VIEIRA, W. F.; KENZO-KAGAWA, B.; ALVARES, L. E.; COGO, J. C.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Exploring the ability of low-level laser irradiation to reduce myonecrosis and increase *Myogenin* transcription after *Bothrops jararacussu* envenomation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 20, n.1, p. 571-583, 2021. DOI: 10.1007 / s43630-021-00041-x.

WAIDDYANATHA, S.; SILVA, A.; SIRIBADDANA, S.; ISBISTER, G. K. Long-term Effects of Snake Envenoming. **Toxins (Basel)**, v. 11, n. 4, p. 193-205, 2019. DOI: 10.3390 / toxins11040193.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**, p. 1-8, 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1277958/retrieve>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Snakebite under spotlight in Oxford**, 2017 [Acessado em 13 de junho de 2021]. Disponível em: http://www.who.int/snakebites/news/Snakebite_under_spotlight_in_Oxford/en.

YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 23–67, 2013. DOI: 10.1152 / physrev.00043.2011.

APÊNDICE I

Ficha clínica para aplicação de laser de baixa intensidade

Ação biológica esperada:

Tecido alvo

Pele
Tendão
Músculo
Osso
Nervo

Características do tecido

Cor:

Distância do tecido alvo: Edema () Sim () Não Capa de gordura () Sim () Não

Parâmetros de aplicação

Comprimento de onda (nm)
Potência (mW)
Densidade de Potência (W/cm²)
Densidade de Energia (J/cm²)
Energia ou Fluência (J)
Tempo de aplicação (s)
Área da sessão transversal do feixe laser (cm²)

Modo de emissão

Contínuo

Descrição da intervenção

Com contato Sem contato com a pele (distância em cm):
Pontual: Número de pontos: Espaço entre pontos:
Varredura
Expansão do feixe laser
Área da lesão (cm²)
Número de sessões
Intervalo entre sessões

Cointervenção com corticoides

Sim () Não ()

Calibração do aparelho

Teste de saída do equipamento:
Antes da terapia:
Depois da terapia:

Adaptação dos parâmetros propostos por FERREIRA (2016).

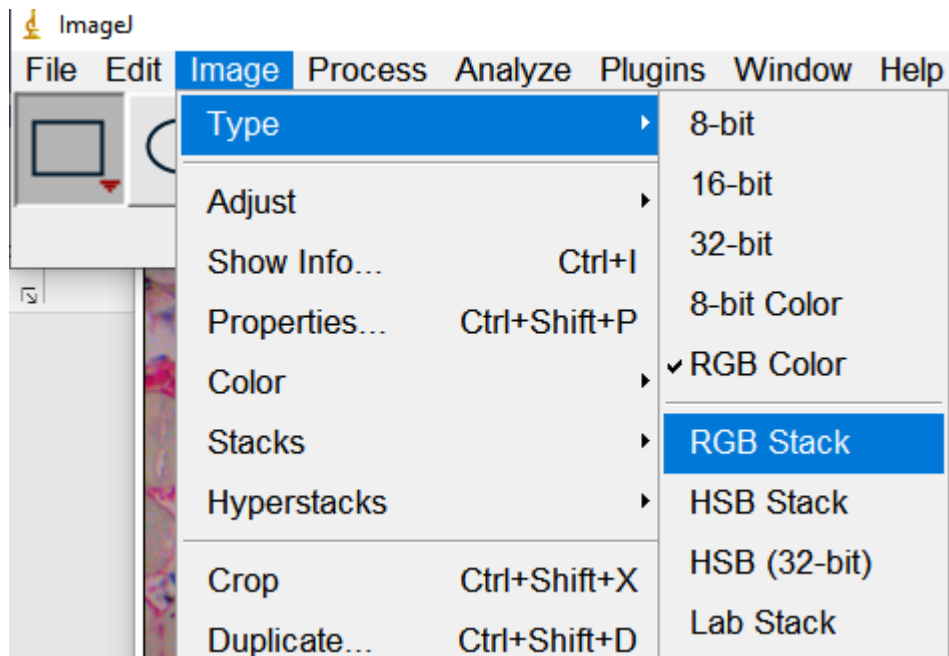
APÊNDICE II

Acompanhamento clínico e comportamental dos animais								
Identificação								
Grupo: V ()	I ()	V+I ()	C ()	Tempo de tratamento:			Número:	
Alterações clínicas	24 horas		48 horas		72 horas		144 horas	
Status	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Hemorragia local								
Claudicação								
Ascensão para abdome								
Formação de crosta								
Redução da movimentação								
Reflexo de propriocepção								
Peso								

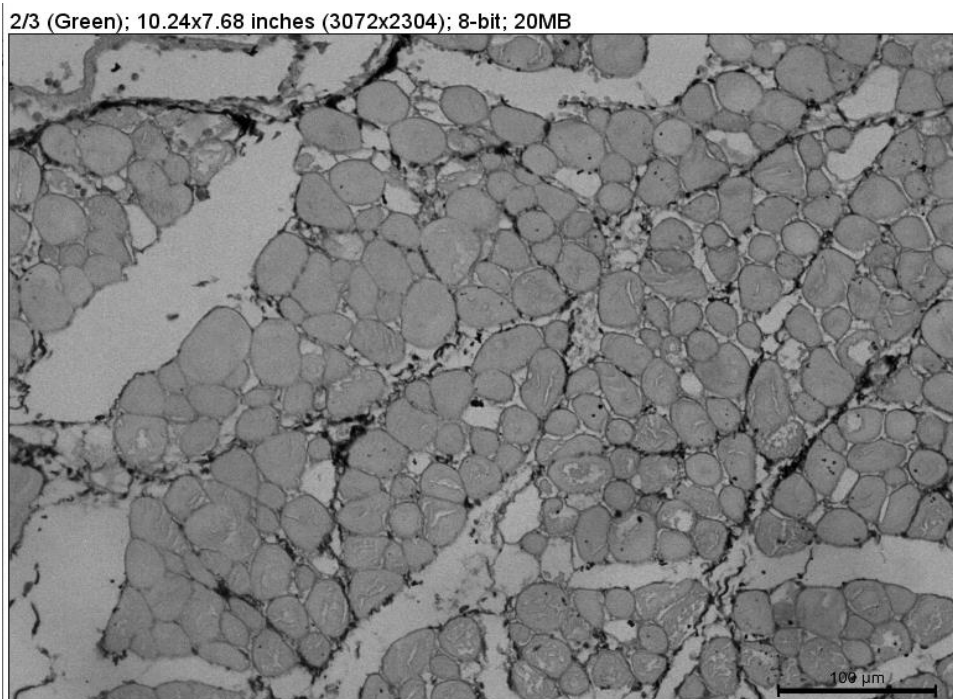
Alterações adicionais:

APÊNDICE III - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA DE COLÁGENO

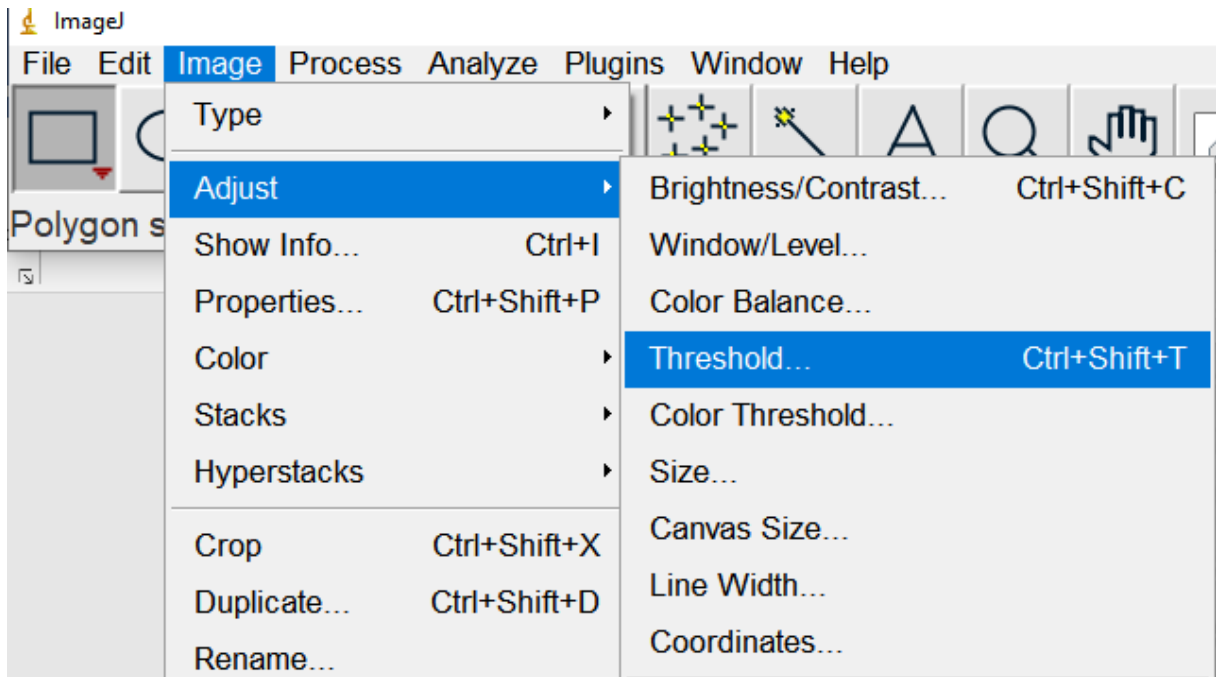
1- Alteração do tipo de imagem de RGB color para RGB Stack.



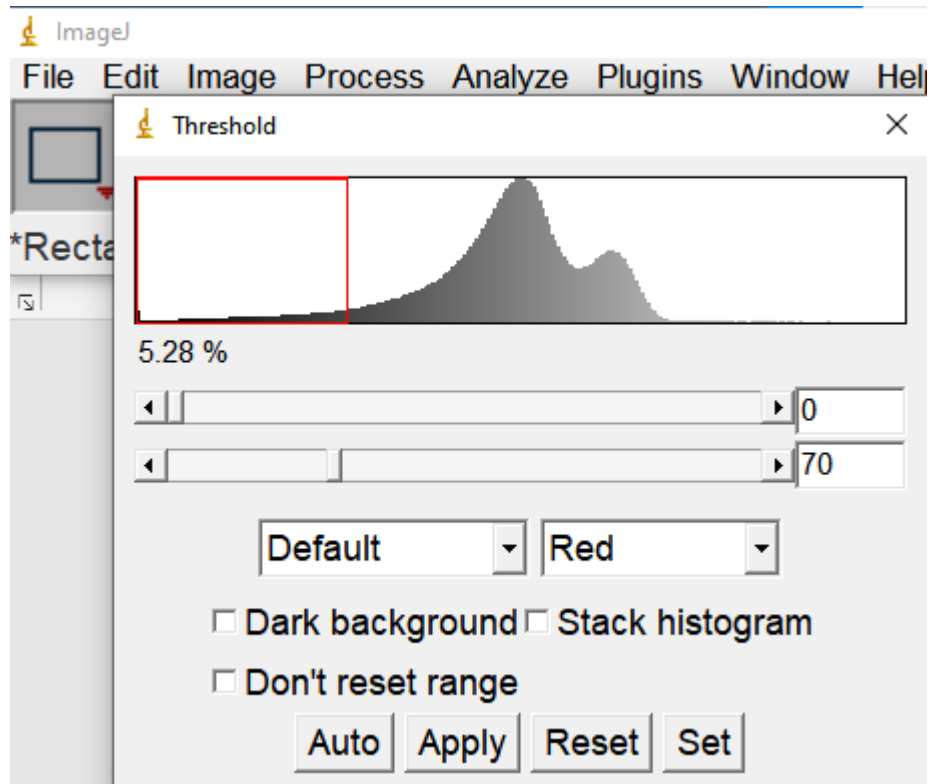
2- Seleção da imagem no espectro Green.



3- Seleção da ferramenta de ajuste da imagem *Threshold*.

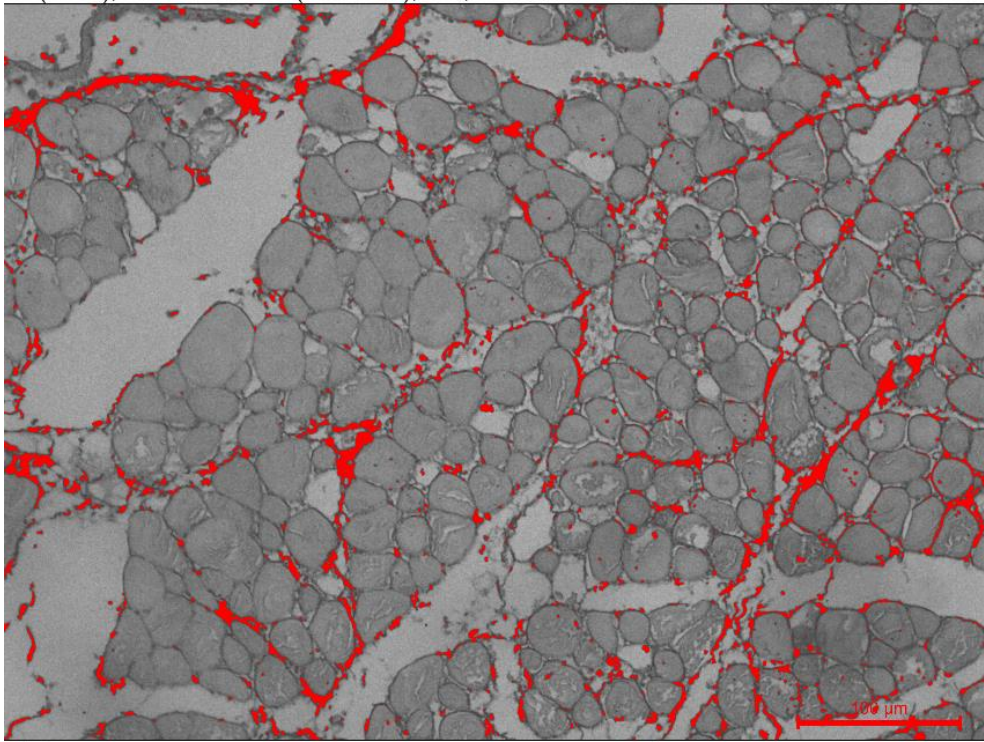


4- Ajuste do *Threshold* de acordo com o subgrupo avaliado.



5- Imagem gerada a partir do ajuste do *Threshold*

2/3 (Green); 10.24x7.68 inches (3072x2304); 8-bit; 20MB



6- Seleção da ferramenta *Measure*

