

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ROSANY DOIN ALMEIDA SILVA

**AÇÃO DA IRRADIAÇÃO POR LASER DE BAIXA ENERGIA HeNe NAS
ALTERAÇÕES MUSCULARES CAUSADAS PELA INOCULAÇÃO DE
VENENO BRUTO DE *Bothrops jararacussu*. ESTUDO *IN VIVO* EM RATOS.**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Fisioterapeuta – Rosany Doin Almeida Silva.

Campinas, 11 de dezembro de 2003.


Profa. Dra. Maria Alice de Cruz-Höfling
- Orientadora -

Campinas

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ROSANY DOIN ALMEIDA SILVA

**AÇÃO DA IRRADIAÇÃO POR LASER DE BAIXA ENERGIA HeNe NAS
ALTERAÇÕES MUSCULARES CAUSADAS PELA INOCULAÇÃO DE
VENENO BRUTO DE *Bothrops jararacussu*. ESTUDO *IN VIVO* EM RATOS.**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre.*

Orientação: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Co-orientação: Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni

Campinas- 2003

NIDADE	BC
ª CHAMADA	I UNICAMP
	Si 38 a
	EX
OMBO BCI	60617
ROC.	16.11.04
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
'REÇO	11,00
DATA	17.11.04
ª CPD	

ifid 329973

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si38a

Silva, Rosany Doin Almeida

Ação da irradiação por laser de baixa energia HeNe nas alterações musculares causadas pela inoculação de veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Estudo *in vivo* em ratos / Rosany Doin Almeida Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores: Maria Alice da Cruz-Höfling, Lea Rodrigues Simioni
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Laser. 2. Miografia. I. Maria Alice da Cruz-Höfling. II. Lea Rodrigues Simioni. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Membros:

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Profa. Dra. Ana Cláudia Mattiello-Sverzut

Profa. Dra. Agélica de Fátima de Assunção Braga

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/12/2003

2003 9838

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

a Deus,

aos meus pais,

ao Jetro,

ao André,

à Sara.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de algumas pessoas e instituições, e eu agradeço especialmente:

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling a quem devo a orientação geral deste trabalho. Suas numerosas sugestões, sua forma exigente, crítica e criativa, não só melhoraram o trabalho em si, mas também a escrita desta dissertação.

À Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni, que como co-orientadora acompanhou de perto a realização deste trabalho. Por ser uma interlocutora paciente e generosa. Pela confiança depositada em meu trabalho. Por sua amizade. Pela alegria de trabalharmos juntas.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop e ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto pelas excelentes sugestões e críticas feitas durante o exame de qualificação.

À Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga cujas sugestões valiosas no exame de qualificação, pré-banca e banca contribuíram para ampliar a qualidade desta pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Claudia Mattiello-Sverzut pela participação na pré-banca e banca de mestrado, que certamente enriqueceu o trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Baranauskas pelas informações fundamentais e conceitos teóricos diversos sobre a irradiação laser de baixa energia HeNe.

Ao Dr. Glauco José Longo pelas aulas e discussões valiosas sobre dosimetria e ação da irradiação laser nos tecidos.

Ao Dr. Atilio Mauro Suart pela sua grandeza e generosidade.

À Faculdade de Engenharia Mecânica e ao Prof. Dr. Sergio Gama, que permitiram a utilização do equipamento Neophot na observação das amostras.

À RAS Tecnologia Com. e Ind. Ltda. Na pessoa do Sr Roberto Avelino dos Santos pelo empréstimo do equipamento de laser utilizado nesta pesquisa.

À KLD Equipamento Eletrônicos Ltda pela assistência técnica e calibração do aparelho de laser utilizado.

À Sra. Cleusa de Oliveira Franco e ao Sr. Sergio Gomes da Costa pelo auxílio técnico no preparo e análise das amostras.

Ao Sr. Neder Piagentini do Prado pelo trabalho fotográfico.

Ao amigo Gildo Bernardo Leite, cuja atuação no laboratório vai muito além de auxílio e orientação técnica. Atmosfera amena, constante cooperação e pronta solicitude são características do seu trabalho.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular, em particular à Priscila, pelo auxílio na dosagem dos níveis séricos de CK e à Profa. Dra. Yoko Oshima Franco pelos valiosos comentários e sugestões.

À CAPES pelo apoio financeiro que muito contribuiu para a viabilização deste projeto de pesquisa.

À minha família pelo apoio, compreensão e amor constante.

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	11
1.1 Aspectos Históricos do Laser	15
1.2 Considerações Teóricas da Irradiação Laser	18
1.3 Efeitos da Irradiação Laser Sobre os tecidos	21
1.4 Estrutura do Músculo Esquelético	22
1.4.1 Junção Neuromuscular	24
1.4.2 Reação Muscular à Agregação	26
1.5 Patogênese dos Venenos Botrópicos	28
2. Objetivos Gerais	31
2.1 Objetivos Específicos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1 Veneno	32
3.2 Animais	32
3.3 Procedimento Cirúrgico	32
3.4 Microscopia Óptica	34
3.4.1 Análise Histopatológica e Morfométrica	34
3.5 Estudo para Determinação do Efeito Dose-resposta do Veneno de Bjssu na Preparação Neuromuscular <i>in vivo</i>	35
3.6 Programa de Tratamento com Irradiação Laser HeNe	35
3.6.1 Descrição dos Grupos Experimentais	37
3.7 Determinação dos Níveis Séricos de Creatino Quinase (CK)	38

3.8 Análise Estatística	39
4. Resultados	40
4.1 Estudo para Determinação do Efeito Dose-resposta do Veneno de Bjssu na Preparação Neuromuscular <i>in vivo</i>	40
4.2 Programa de Tratamento com Irradiação Laser HeNe	41
4.3 Determinação dos Níveis Séricos de Creatino Quinase (CK)	49
5. Discussão	50
5.1 Estudo para Determinação do Efeito Dose-resposta do Veneno de Bjssu na Preparação Neuromuscular <i>in vivo</i>	50
5.2 Determinação dos Níveis Séricos de Creatino Quinase (CK)	51
5.3 Programa de Tratamento com Irradiação Laser HeNe	52
6. Conclusão	58
7. Referências Bibliográficas	60
8. Anexo	71

RESUMO

RESUMO

O tratamento com antivenenos tem se mostrado pouco eficaz para prevenir ou minimizar os efeitos locais, que rapidamente se desenvolvem nos acidentes botrópicos. Assim, procedimentos complementares são necessários para um tratamento mais efetivo, e voltado para a prevenção das lesões locais. Neste trabalho, descrevemos alguns efeitos da irradiação laser HeNe no músculo esquelético de rato injetado com veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu). O músculo tibial anterior esquerdo de ratos Wistar adultos machos (250-350 g) anestesiados, foi injetado no seu terço médio com veneno (60 µg/0.02 ml) ou solução salina (0.9%). Três doses de laser HeNe ($\lambda = 632.8$ nm, 3 mW) foram administradas : 3,5 J/cm² -9 seg; 10,5 J/cm² - 27 seg (uma única exposição) e 3,5 J/cm² - 9 seg (a cada 20 min – por três vezes) após 60 min da inoculação de Bjssu e o registro miográfico foi observado durante 60 – 120 min e comparado com o dos músculos não irradiados. Foram feitas a dosagem do nível sérico de CK e a análise histopatológica e morfométrica. Os músculos irradiados com dose de 3,5 J/cm² (em única ou em três exposições em intervalos de 20 min cada) mostraram uma porcentagem de área lesada significativamente menor (64% e 40.5%, respectivamente, - $15,9 \pm 1,5\%$ e $26,3 \pm 4,5\%$, respectivamente, $p < 0,05$) em comparação com a área lesada dos músculos não irradiados ($44,2 \pm 5,7 \%$), e uma diminuição significativa (62%) do bloqueio neuromuscular (3,5 J/cm² uma única exposição) ($11,5 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$) comparados com o grupo não irradiado ($28,6 \pm 4,7\%$). Houve uma diminuição significativa nos níveis séricos de CK no grupo irradiado com laser (3.5 J/cm² – uma única exposição) quando comparado com o grupo que não foi tratado com laser ($190.3 \pm 23.4\%$ vs $455 \pm 43\%$, respectivamente) ($p < 0.05$). Sugere-se que doses adequadas de irradiação com laser de baixa intensidade - HeNe, nesse modelo experimental, podem produzir redução na necrose pós-envenenamento por jararacuçu e uma melhora na performance muscular.

ABSTRACT

Antivenom therapy is ineffective in neutralizing the severe local tissue damage following a snakebite envenoming. The need for an effective first-aid regimen aimed at minimizing these effects is of uttermost importance. Here we describe some effects of HeNe laser irradiation on muscle injected with *B. jararacussu* (jararacuçu) crude venom. The *tibialis* anterior muscle of adult anesthetized Wistar rats were injected in its medium third either with venom (60 µg/0.02 ml) or saline. Three He-Ne laser incident energy densities ($\lambda = 632.8$ nm, 3 mW): 3.5 J/cm² (single exposure); 3.5 J/cm² (three exposures at each 20 min) and 10.5 J/cm² were administered after 60 min post-venom and a myographic record was taken from 60 to 120 min and compared to unirradiated muscles. Serum CK levels measurements and histopathological/morphometrical analysis were also done. The energy density of 3.5 J/cm² (single or three exposures) induced a significant decrease of 64% and 40.5%, respectively, of the injured area ($15.9 \pm 1.5\%$ and $26.3 \pm 4.5\%$, respectively, against $44.2 \pm 5.7\%$ in unirradiated ones, $p < 0.05$), and a significant (62%) decrease of the neuromuscular blockade (3.5 J/cm², single dose) ($11.5 \pm 2.5\%$, $p < 0.05$) compared to the unirradiated group ($28.6 \pm 4.7\%$). Serum CK levels ranged from $455 \pm 4.5\%$ in unirradiated envenomed rats to $190.3 \pm 23.4\%$ in irradiated rats (3.5 J/cm², single exposure) ($p < 0.05$). We suggest that HeNe laser irradiation at appropriate dosage, reduces myonecrosis caused by jararacuçu snake venom and improves muscle performance.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

As lesões musculares podem ser de ordem física, como feridas cirúrgicas ou trauma mecânico; congelamento, ou calor excessivo; como também podem ser por alteração química (anóxia, anestésicos locais, dentre outros) (Grassino *et al.*, 2000). Dentre as lesões de ordem química podemos citar também as que acontecem em decorrência de acidentes ofídicos. Essa condição é muito comum nos países tropicais. De acordo com dados da Fundação Nacional de Saúde (2001), cerca de 70% dos pacientes picados por serpentes são do sexo masculino, e estão numa faixa etária entre 15 e 49 anos. No acidente botrópico o índice de letalidade é menor que no crotálico, mas ele ganha importância pela alta incidência (90,5%) e pelas características de morbidade e efeitos locais do envenenamento.

Dentre as espécies botrópicas a *Bothrops jararaca* é o agente causador mais freqüente (Ribeiro & Jorge, 1990), entretanto outras espécies também possuem grande importância médica, como por exemplo, a *B. neuviedi*, *B. erythromelas*, *B. moojeni*, dentre outras. A *B. jararacussu* (popularmente conhecida como jararacuçu) é a maior serpente do gênero, chegando, em alguns casos, a medir 2,5 metros, e possui uma grande capacidade de inoculação do veneno (400 mg numa única extração) (Vital Brazil, 1982) (Fig 1).

O veneno da jararacuçu possui atividades que levam a distúrbios fisiopatológicos importantes que incluem destruição tecidual (ação proteolítica), alteram o consumo de fibrinogênio (ação anti-coagulante), e provocam lesões na membrana basal dos capilares por ação das hemorraginas (ação hemorrágica). Esses

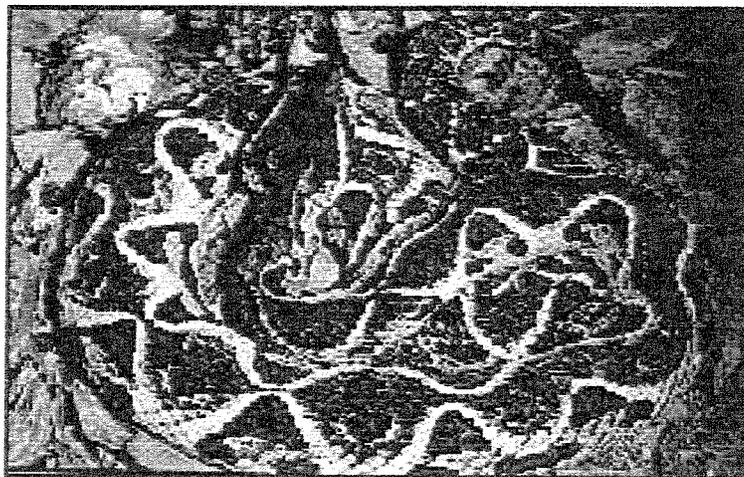


Figura 1 - *Bothrops jararacussu* LACERDA, encontrada no Estado de Mato Grosso, extremo sul da Bahia, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e noroeste do Rio Grande do Sul (Campbell & Lamar, 1989). Fonte: Alves *et al.*, 1996.

distúrbios fisiopatológicos são de caráter precoce e progressivo e levam a um quadro clínico de dor, edema inflamatório, flictena, abscesso, formação de equimose e algumas vezes síndrome compartimental (Ribeiro & Jorge, 1989, 1990). Estes efeitos ocasionam, dentre outras lesões, a necrose de tecidos moles, incluindo a mionecrose (Harris & Cullen, 1990). A perda de tecido muscular no local e em regiões adjacentes pode levar a seqüelas funcionais permanentes (Fig. 2) (Ribeiro & Jorge, 1990).

Esses fenômenos locais têm sido objeto de estudo em diferentes modelos experimentais e espécies animais (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Oshima-Franco *et al.*, 2000; Almeida-Silva *et al.*, 2001; De Souza-Queiroz *et al.*, 2002).

O tratamento específico do envenenamento consiste na administração do

soro antibotrópico, ou, na falta deste, das associações antibotrópico-crotálica ou



Figura 2 - Fasciotomia pós complicação de síndrome compartimental causada por acidente ofídico pela serpente *B. jararacussu*. Foto cedida pelo Hospital Vital Brazil, São Paulo, SP.

antibotrópico-laquéica. São também tomadas medidas para controle das reações sistêmicas: posicionamento do membro afetado, emprego de analgésicos, hidratação e antibióticoterapia, se necessário (Ministério da Saúde do Brasil, 1998).

A terapia com antivenenos não tem demonstrado um resultado efetivo para prevenir ou mesmo minimizar as seqüelas locais, e mais especificamente, a mionecrose que freqüentemente se desenvolve nos acidentes botrópicos.

A gravidade dos efeitos locais tem levado muitos cientistas a investigar não apenas o fenômeno biológico que rapidamente se desenvolve, como também a compreender a patogênese do envenenamento numa tentativa de encontrar um novo

tratamento para preveni-los. Dada a importância médica, social e econômica (atinge pessoas na idade produtiva), a procura de medidas terapêuticas alternativas às já existentes é de grande relevância.

Uma forma de tratamento não invasiva que vem ganhando crescente interesse em ciência básica, como também em vários ramos das ciências médicas, é a terapia com laser de baixa potência. Apesar de a utilização da laserterapia já ter começado a quase meio século atrás (década de 60), o seu emprego clínico na prática médica é relativamente pouco expressivo. Os efeitos sobre processos biológicos, que podem adquirir interesse terapêutico, vão desde estímulos à angiogênese e/ou ativação da microcirculação, sanguínea e linfática, síntese de colágeno por parte dos fibroblastos e por consequência reparação por tecido conjuntivo e outros inúmeros efeitos tróficos, anti-inflamatórios (anti-edematosos) e analgésicos.

Tem sido demonstrado de forma crescente que a energia transferida, sob a forma de luz, pela irradiação laser de baixa energia, num tecido, induz alterações que vão desde ativação da síntese de ATP, e portanto do metabolismo celular (Pastore *et al.*, 1996); ativação da síntese de DNA e por consequência, a atividade mitótica (Schwartz *et al.*, 2002); função das células satélites, que são células mesenquimais quiescentes responsáveis pela regeneração do músculo esquelético (Shefer *et al.*, 2002); ativação de fatores de crescimento endotelial de vasos (Bibikova *et al.*, 1994), até a proliferação de fibroblastos que são importantes no papel cicatricial e reparo tecidual (Enwemeka, 1992). Essas pesquisas têm sido feitas em diversos sistemas biológicos como tecido ósseo e cartilaginoso (Akai *et al.*, 1997; Kovach &

Athnasiou, 1997; Luger *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2000), nervos (Rochkind *et al.*, 1989; Anders *et al.*, 1993); pele (Surinchak *et al.*, 1983; Tatarunas *et al.*, 1998), tendões (Enwemeka *et al.*, 1990), vasos (Bibikova *et al.*, 1994) e músculos (Bibikova & Oron, 1993). Mais recentemente, Amaral *et al.* (2001), observaram uma melhora significativa no processo de regeneração do músculo tibial anterior de camundongos injetados com a miotoxina ACL (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) e irradiados com laser de baixa intensidade HeNe.

Levando em consideração a patogênese das lesões locais causadas pela ação do veneno de *Bothrops jararacussu* e a ação biomoduladora da irradiação direta do laser de baixa energia HeNe nos tecidos, a laserterapia pode ser uma alternativa de tratamento para proteger, ou mesmo minimizar, o desenvolvimento da mionecrose aguda induzida por venenos ofídicos ou de outros animais peçonhentos.

1.1 Aspectos Históricos do Laser

Desde os tempos antigos a irradiação luminosa (então a luz solar) foi utilizada com fins terapêuticos. Os indianos (1400 AC) recomendavam uma substância fotossensibilizadora obtida de plantas, que aplicada sobre a pele dos pacientes promovia a absorção da luz solar para curar a discromia causada pelo vitiligo. Diversas formas de terapia com luz solar foram difundidas pelos árabes, gregos e romanos para tratamento de doenças de pele (Brugnera & Pinheiro, 1998).

Em 1703, o físico inglês Isaac Newton publicou o resultado de experimentos pioneiros com luz solar, em seu livro intitulado *Optiks*. Ele foi o primeiro a

demonstrar que a luz branca (solar) quando passada através de um prisma se dividia em sete comprimentos de onda do espectro colorido visível. Em 1805 dois físicos alemães, John Herschel e Johann Ritter descobriram que a luz solar também continha componentes não visíveis do espectro eletromagnético, os raios infravermelhos e ultravioletas (Mc Donagh, 2001).

Durante os séculos 18 e 19 a luz solar foi utilizada para tratamento de diversas enfermidades: feridas cutâneas, *lupus vulgaris* (tuberculose da pele), artrite, raquitismo, depressão (Hockberger, 2002).

Um dos grandes avanços da bioengenharia, no século XX, foi o desenvolvimento dos equipamentos de laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Em 1917, Albert Einstein, tomando como base a teoria quântica de Plank (1900), enumerou no seu artigo “Zur Quantum Theorie der Strahlung” (teoria quântica da radiação) conceitos sobre a radiação eletromagnética em termos de absorção e emissão espontânea de radiação (Tarac & Stojanovic, 1999).

As ondas eletromagnéticas (Raios Gama, Raios X, Ultravioleta, Luz visível, Microondas, Rádio e Infravermelho) podem ser definidas por seus comprimentos de onda, e frequência. Quanto menor o comprimento de onda, maior a energia associada. A maioria do espectro eletromagnético é invisível ao olho humano, só uma pequena faixa compreende a luz visível. A radiação laser é um tipo de fonte luminosa eletromagnética. Os raios laser têm um comprimento de onda que varia aproximadamente entre 190 e 10600 nm (Colls-Cruañes, 1984).

O primeiro equipamento de laser, foi feito a partir de um cristal de rubi ($\lambda=694$ nm), em 1960 por Theodore Maiman (Tarac & Stojanovic, 1999). Seis meses depois Ali Javan inventou o primeiro laser óptico contínuo a gás Hélio Neônio (Pfau, 2002). Posteriormente outros tipos de lasers foram desenvolvidos: semicondutores como o Arsenieto de Gálio (AsGa) (1962); o de Neodímio-Yttrium Aluminium Garnet (Nd:YAG), o de argônio (Ar) e o de Dióxido de Carbono (CO₂) (1964) (Steen, 1998).

Em 1961 foi fundado o primeiro laboratório de laser para aplicações médicas, na Universidade de Cincinnati, por Leon Goldman, onde foram realizadas as primeiras experiências em animais (Goldman, 1981). Desde então o uso do laser na medicina tem sido amplo, por exemplo em processos cirúrgicos na oftalmologia, dermatologia, oncologia, dentre outras especialidades. A laserterapia de baixa energia é uma denominação voltada para lasers com potências menores que 1 W.

As aplicações clínicas do laser de baixa potência (HeNe), com efeitos térmicos mínimos, foram primeiramente estudadas por Mester no final da década de 60 e início dos anos 70, e compreendiam radiação com emissão na região do visível. Ele demonstrou o efeito da irradiação por laser de baixa intensidade na “bioestimulação” (termo utilizado por ele) dos tecidos, principalmente no processo de cicatrização e regeneração do tecido conjuntivo (Mester *et al.*, 1985). Nos últimos anos as pesquisas sobre a ação da irradiação do laser de baixa energia se intensificaram com estudos em diferentes áreas: função celular (Karu *et al.*, 1995; Pastore *et al.*, 2000), estudos com diferentes modelos experimentais em animais (Bibikova & Oron, 1995;

Tatarunas *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2001; Garavello *et al.*, *in press*), e estudos pré-clínicos e clínicos (Rochkind & Quaknine, 1992; Giavelli *et al.*, 1998; Schindl *et al.*, 2002).

1.2 Considerações Teóricas da Irradiação Laser

A radiação laser é uma fonte luminosa que utiliza a luz emitida por um átomo ou molécula para estimular a emissão de mais luz por outros átomos ou moléculas, e, neste processo, amplificar a luz original.

O sistema atômico é composto por um núcleo, positivamente carregado e orbitado por elétrons, negativamente carregados. Esses elétrons se posicionam em níveis de energia bem definidos, denominados orbitais. Essas camadas eletrônicas (as orbitais) são representadas pelas letras K, L, M, N, O, P e Q. Apenas um determinado número de elétrons pode ocupar um dado nível de energia e nenhuma forma de radiação acontece quando os elétrons se mantêm em seus níveis orbitais. As camadas eletrônicas mais próximas do núcleo apresentam menor quantidade de energia. Um átomo está em estado fundamental quando seus elétrons ocupam as camadas menos energéticas.

Quando um átomo recebe energia térmica ou elétrica, o elétron pode saltar para uma camada mais externa (mais energética), deixando o átomo instável. Esse estado de excitação não é normal, ele retém essa energia por uma fração de segundo, e a seguir volta ao seu estado estável (repouso) liberando-a sob forma de fótons de luz. Quando o número de átomos do estado excitado for maior que no estado

fundamental (situação denominada inversão de população) haverá um aumento da intensidade do feixe luminoso e uma amplificação da radiação (Tarac & Stojanovic, 1999).

No laser de Hélio-Neônio, de luz vermelha, o meio ativo é uma mistura dos gases nobres Hélio (He) (90%) e Neônio (Ne) (10%). O número atômico do He é 2 e o do Ne é 10, e sua configuração eletrônica é $1s^2, 2s^2, 2p^6$. Após uma descarga elétrica no interior do gás, muitos átomos de He passam para o estado instável deslocando-se de 1s a 2s. As colisões entre os átomos instáveis de He e Ne, contidos numa cavidade laser deslocam elétrons de Ne para os níveis 4s ou 5s, nível de energia muito semelhante ao 2s do He. Uma vez transferida a sua energia os átomos de He voltam ao estado fundamental irradiando uma onda eletromagnética (Colls-Cruañes, 1984).

A cavidade laser (também chamada de Perot-Fabry), é uma câmara que varia de tamanho dependendo do meio ativo que contém e da potência do aparelho de laser, geralmente tem a forma cilíndrica com dois espelhos posicionados em suas extremidades. Um deles é totalmente refletivo (100%), e o outro é parcialmente refletivo (99%) e com um orifício, o que permite a saída da radiação de dentro da cavidade, formando o raio laser (Brugnera & Pinheiro, 1998).

A tabela a seguir mostra os meios ativos e o comprimento de onda de alguns tipos de laseres (Brugnera & Pinheiro, 1998):

MEIO ATIVO	TIPO DE LASER	COMPRIMENTO DE ONDA (dados em nm)
Gasoso	CO ₂	10.600
	Argônio	481 – azul
		514 - vermelho
	Hélio-Neônio	632.8 - vermelho
Isolantes dopados	Nd:YAG	1060
	Er:YAG	2940
	Ho:YAG	2100
Corantes	Rodamina 6G	580
	Cumarina 2	450
Semicondutores	Diodo	620 a 1500
	Diodo AsGa	558
Excímeros	ArF	193
	KrF	248
	XeCl	308

A luz laser possui três propriedades: A) monocromaticidade (uma só cor, com mesmo comprimento de onda). O comprimento de onda é importante para determinar os efeitos terapêuticos do tratamento por laser. B) colimação (todos os raios são paralelos entre si, mantendo essa característica mesmo em longas distâncias). C) coerência (as ondas luminosas estão em fase, isto é, os picos e vales dos campos elétrico e magnético ocorrem todos ao mesmo tempo – coerência temporal – e viajam na mesma direção – coerência espacial) (Baxter, 1994).

O raio luminoso sai da cavidade laser com uma determinada concentração de luz. Essa potência da fonte luminosa dividida pela área de emissão denomina-se densidade de potência (DP) ou irradiância ($DP = W/cm^2$). Multiplicando-se a irradiância pelo tempo de exposição (dado em segundos) obtém-se a densidade de energia (DE) ou fluência, descrita em J/cm^2 . Então, pode-se definir densidade de

energia, ou fluência, como sendo a quantidade de energia (Joules) concentrada numa determinada superfície ($DE = J/cm^2$).

1.3 Efeitos da Irradiação Laser Sobre os Tecidos

A bioestimulação decorrente da irradiação pelo laser de baixa energia pode ser um fenômeno fotobiológico, desde que a absorção da irradiação pelos tecidos ocorra por meio de seus cromóforos naturais, como por exemplo os pigmentos heme presentes na hemoglobina, mioglobina e bilirrubina, o pigmento citocromo da cadeia respiratória na mitocôndria, o pigmento melanina e outras substâncias que fazem fotoreações (Van Gemert *et al.*, 1989; Karu, 1989; Wilson & Jacques, 1990). A energia absorvida pelos tecidos através dos campos eletromagnéticos, provocará uma espécie de ressonância desses campos com as biomoléculas, alterando cargas específicas nas membranas e nas superfícies das proteínas. Ou seja, a irradiação de um tecido com laser, introduz energia no sistema biológico, a qual será utilizada após conversão em outro tipo de energia apto ao seu consumo. Esse fenômeno pode provocar modificações na conformação molecular ou configuração espacial dessas substâncias, podendo desencadear diferentes respostas (Charman, 1990). Por exemplo, o mecanismo de ação da laserterapia de baixa energia em nível celular pode estar baseado no aumento do metabolismo oxidativo na mitocôndria causado por excitação eletrônica dos componentes da cadeia respiratória (Karu *et al.*, 2001). Esse efeito pode permanecer por várias horas após a irradiação (Fedoseyeva *et al.*, 1988).

O índice de absorção da irradiação depende do comprimento de onda, da densidade de energia e da natureza do tecido. A dose de irradiação ou densidade de energia é o parâmetro mais importante na laserterapia. Se a dose for demasiado baixa ($< 0,1 \text{ J/cm}^2$), ou muito alta ($> 10 \text{ J/cm}^2$) não se obtém estimulação. Sob este ponto de vista, deve-se ter em mente que o efeito da irradiação a laser é cumulativo, se várias aplicações forem feitas. Portanto, irradiações com baixa densidade de energia promovem a regulação do metabolismo celular, por outro lado, irradiações com alta densidade de energia inibem o mecanismo fotodinâmico (Karu, 1989).

1.4 Estrutura do músculo esquelético

O músculo esquelético pode se constituir em estrutura compartimentada complexa. Anatomicamente é formado por células contráteis, normalmente chamadas fibras musculares devido à sua característica morfológica alongada. Essas fibras possuem uma estrutura de suporte, composta de tecido conjuntivo, em forma de bainhas ou fâscias. O tecido conjuntivo que envolve individualmente as fibras musculares, é chamado endomísio, o que envolve os fascículos (agrupamento de fibras) chama-se perimísio, e o que envolve o músculo externamente é denominado epimísio. Os vasos sanguíneos e nervos penetram nos músculos através do epimísio, perimísio até o endomísio de cada célula muscular.

As fibras musculares são células alongadas e multinucleadas, com 10 a 100 μm de diâmetro, e que podem medir poucos milímetros a vários centímetros de comprimento. Os núcleos dessas fibras se localizam na periferia da célula, abaixo da

membrana plasmática (sarcolema). A lâmina basal separa a fibra muscular da matriz extracelular (endomísio); entre ela e o sarcolema encontram-se células satélites, que são células mesenquimais indiferenciadas responsáveis pelo eventual reparo parcial de lesões do músculo esquelético e processos regenerativos. Em músculos normais adultos essas células são quiescentes. Após uma lesão nas fibras musculares, essas células são ativadas, proliferam e fundem-se para formar novas fibras musculares, ou para repararem segmentos danificados de fibras musculares existentes.

O citoesqueleto das células musculares é organizado em miofibrilas e ocupa grande volume do sarcoplasma. As miofibrilas possuem miofilamentos grossos e finos. O miofilamento fino é constituído pela actina, tropomiosina e troponina, e o miofilamento espesso é constituído pela miosina. A distribuição dos miofilamentos é sempre igual ao longo da miofibrila e graças a essa regularidade e periodicidade, as miofibrilas apresentam faixas alternadas claras e escuras. As faixas mais claras chamam-se banda I (isotrópica) e contêm apenas os miofilamentos de actina, bem como as proteínas, tropomiosina e troponina. No centro da banda I existe uma linha que se cora mais intensamente, denominada linha Z, que é o local onde se inserem as extremidades dos filamentos de actina de sarcômeros adjacentes, presos pelas proteínas α - actinina e desmina. A faixa central, mais escura, é chamada banda A (anisotrópica), e é formada por filamentos de miosina e pelo embricamento de filamentos de actina e miosina nas laterais da banda. Dentro da banda A existe uma região mediana mais clara – a banda H – que contém apenas miosina. Um sarcômero

compreende o segmento entre duas linhas Z, consecutivas sendo constituído portanto pela banda A e duas hemi-bandas I. É a unidade morfofuncional contrátil da fibra muscular, pois é a menor porção da fibra muscular com capacidade de encurtamento e distensão. A contração da fibra muscular esquelética ocorre quando há o deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina. Há dois sistemas na membrana da fibra muscular esquelética que estão relacionados com a contração muscular – o retículo sarcoplasmático e o sistema T. O retículo sarcoplasmático RS envolve o grupo de miofilamentos formando uma rede de cisternas que se justapõem de forma estreita com os túbulos T. O sistema T é um conjunto de invaginações tubulares transversais do sarcolema. O túbulo T está sempre envolvido pelas cisternas terminais do RS, constituindo tríades, que por sua vez localizam-se nas junções das bandas A e I de cada sarcômero. Esse sistema é responsável pela transmissão do impulso nervoso de forma a proporcionar a contração sincronizada das miofibrilas constituintes de cada fibra muscular estriada esquelética (Fig. 3). Para revisão ver: Harris & Cullen, 1990; Spence, 1991; Junqueira & Carneiro, 1999; Renault *et al.*, 2000.

1.4.1 Junção Neuromuscular

A unidade motora é a unidade funcional do músculo esquelético. É formada pelo neurônio motor e as fibras musculares inervadas por ele. Os neurônios motores formam sinapses com fibras musculares, através dos axônios, em regiões especializadas da membrana muscular chamadas de placas motoras ou junção

neuromuscular. O nervo motor se divide, na altura dos nódulos de Ranvier, em diversos ramos com aproximadamente 2 μm de espessura. Cada ramo forma dilatações múltiplas, os botões sinápticos, que são cobertas por uma fina camada de células de Schwann. Esses botões são separados da membrana da fibra muscular por uma fenda sináptica de 50 nm. Cada botão pré-sináptico contém mitocôndrias e vesículas sinápticas agrupadas em torno das zonas ativas que são os sítios de liberação da acetilcolina.

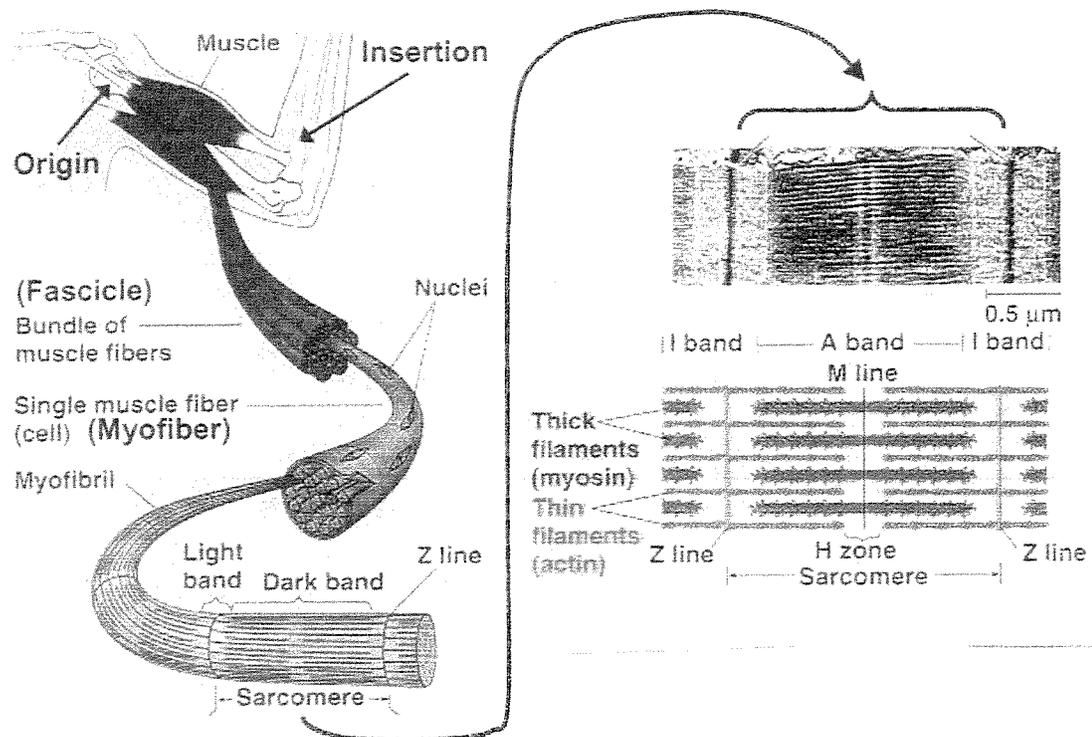


Figura 3 - Estrutura do músculo esquelético. biosci.usc.edu/courses/2001

Internet acessada dia 09/05/2003 11:45h

Um potencial de ação no neurônio motor pré-sináptico faz com que a

acetilcolina seja liberada nas zonas ativas. Ela se difunde pela fenda sináptica e se fixa ao receptor nicotínico de acetilcolina na junção neuromuscular, resultando na abertura dos canais aos cátions (Na^+ e K^+), e um influxo de Na^+ gera um potencial de ação muscular, que se propaga na membrana da fibra muscular nas duas direções do músculo. O potencial de ação despolariza a membrana da fibra muscular e penetra no interior desta fazendo com que o retículo sarcoplasmático e o sistema T libere o cálcio ali armazenado para o citoplasma. Ao entrar em contato com as miofibrilas o Ca^{++} desbloqueia os sítios de ligação da actina e permite que esta se ligue à miosina dando início à contração muscular (Fig. 4).

A energia para a contração muscular é suprida por moléculas de ATP produzidas durante a respiração celular. O ATP atua tanto na ligação da miosina à actina quanto em sua separação. Para revisão ver: Harris & Cullen, 1990; Kandel *et al.*, 1991; Guyton, 1998; Grassino *et al.*, 2000; Carlsen & Villarin, 2002; Mazzarello *et al.*, 2003.

1.4.2 Reação Muscular à Agressão

Os mecanismos de necrose muscular são semelhantes e independem da sua causa (traumas mecânicos ou agentes químicos). Eles estão relacionados com a destruição do sarcolema e um influxo importante de íons cálcio (Ca^{++}) para o interior da célula induzindo a ativação de várias enzimas degradantes como as fosfolipases e proteases dependentes de cálcio, que destroem a membrana celular e das mitocôndrias (Carpenter & Karpati, 1989). O aumento do Ca^{++} citoplasmático

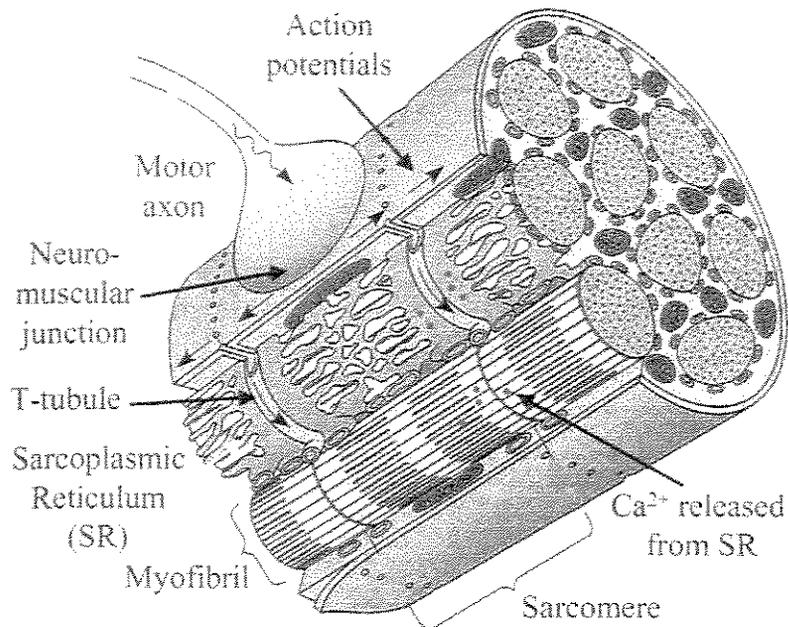


Figura 4 - Controle da contração muscular. biosci.usc.edu/courses/2001
 Internet acessada dia 09/05/2003 11:45h

tem um efeito desestabilizador do citoesqueleto, incluindo a ruptura das uniões intercelulares, o que altera a forma das células e também o transporte e a comunicação intercelular (Grassino *et al.*, 2000). Como o tecido muscular é ricamente vascularizado ocorre rapidamente uma hemorragia no sítio da lesão. As lesões musculares podem também ser complicadas pela destruição de terminações nervosas intramusculares que podem ocasionar a denervação parcial ou total do músculo (Rantanen *et al.*, 1995).

A primeira reação da célula para minimizar a necrose conseqüente da agressão muscular é separar as porções necrosadas das recuperáveis. Isso é feito, nas

primeiras horas após a lesão, através da formação de uma nova membrana que envolve as regiões recuperáveis (Chambers & McDermott, 1996). Em seguida ocorre o processo de fagocitose dos restos de mitocôndrias, sarcômeros e membranas. Leucócitos polimorfonucleares predominam na fase aguda, mas são logo seguidos por monócitos os quais são transformados em macrófagos (Tidball, 1995). A fagocitose é seguida pela revascularização, criação de novos miotúbulos e reinervação (Grassino *et al.*, 2000).

1.5 Patogênese das lesões causadas por venenos botrópicos

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* produz efeitos biológicos importantes no sítio da picada, que se manifestam clinicamente com dor intensa, edema, equimose, flictena, necrose tecidual. Isso ocorre devido a três ações principais dos venenos botrópicos: coagulante, hemorrágica e proteolítica (Ministério da Saúde do Brasil, 1998).

Ação coagulante – a ativação do fator X e da protrombina da cascata de coagulação convertem o fibrinogênio em fibrina podendo ocasionar incoagulabilidade sanguínea por depleção do fibrinogênio. Por outro lado, quando ocorre a ativação do fator X, pode haver também consumo dos fatores V e VII e plaquetas, proporcionando a formação e deposição de microtrombos na rede capilar, levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada, o que pode contribuir para desencadear a insuficiência renal aguda (Kamiguti *et al.*, 1986; Havt *et al.*, 2001).

Ação hemorrágica - é decorrente da ação vasculotóxica de fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Elas agem sobre os capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e depois a integridade da parede endotelial, causando assim a sua ruptura. O edema, que rapidamente ocorre no local da picada, pode ser decorrente da ação das hemorraginas associadas a outras toxinas que liberam substâncias – agentes inflamatórios (como a histamina). Estes são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, ocasionando edema pelo extravasamento de fluídos e infiltrado inflamatório de leucócitos. (Nahas *et al.*, 1979).

Ação proteolítica – decorre, possivelmente, da atividade de proteases, hialuronidases e fosfolipases, presentes nos venenos, e da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno. A ação proteolítica do veneno botrópico provoca, no local da picada, reações como eritema, edema, flictena e necrose das partes moles, inclusive a mionecrose. Esta última é causada devido à ação direta de miotoxinas (com estrutura de fosfolipase A₂) sobre a membrana plasmática das células musculares (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Arni & Ward, 1996).

A resposta muscular à agressão química causada pelo veneno botrópico é semelhante às reações de ordem física. Evidências histológicas, ultraestruturais e bioquímicas indicam que o sarcolema é a primeira estrutura celular afetada por miotoxinas botrópicas (Gutiérrez & Lomonte, 1995). O rompimento da membrana plasmática da célula muscular permite um influxo abrupto de Ca⁺⁺ no interior da

célula desencadeando o processo de degeneração das fibras musculares, o que de acordo com Mebs & Ownby (1990) começa minutos após a exposição do tecido ao veneno.

2 - OBJETIVOS GERAIS

2. OBJETIVOS GERAIS

Este projeto teve como objetivo principal investigar os efeitos da irradiação direta do laser de baixa intensidade HeNe sobre o desenvolvimento das alterações musculares produzidas pela injeção do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* no músculo tibial anterior de ratos *in vivo*, mimetizando um acidente ofídico, na busca de uma alternativa de tratamento para atenuar o desenvolvimento das lesões mionecróticas locais.

2.1 Objetivos específicos:

Realizar um estudo sobre a ação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, em modelo experimental *in vivo*, previamente testado; aplicar um programa de tratamento com laser de baixa energia HeNe nos músculos injetados com veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, através da análise dos dados miográficos, morfológicos, morfométricos e bioquímicos (dosagem de CK) coletados durante o tratamento com laser HeNe.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu), liofilizado, foi doado pelo Instituto Butantã, São Paulo, SP.

3.2 Animais

Rattus norvegicus albinus, linhagem Wistar, machos, adultos (200 a 300 g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp foram acomodados no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, em ambiente higienizado, com controle de temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo de 12 horas) e livre acesso à água e ração balanceada. Este projeto, sob o protocolo nº 425-1 (anexo), foi integralmente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP).

3.3 Procedimento cirúrgico e estudo miográfico

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de hidrato de cloral a 10% na dose de 300 mg/kg de peso corporal. O animal foi colocado em decúbito dorsal e fixado a uma base de cortiça com os membros em abdução. Uma seringa de 10 ml foi adaptada como máscara de oxigênio e acoplada ao focinho (Fig. 5 A).

Após a tricotomia, foi feita uma incisão na região antero-distal da perna esquerda. A pele e os tecidos adjacentes foram divulsionados e o tendão do

músculo tibial anterior esquerdo foi exposto na sua porção distal, seccionado, atado a um fio de algodão e conectado ao fisiógrafo Gould RS 3400 (Ohio, USA) através de um transdutor isométrico (BG-50). Em seguida foi feita uma incisão na porção póstero-lateral da coxa esquerda no trajeto do nervo ciático poplíteo externo (Dal Belo *et al.*, 2002). A tíbia foi fixada bilateralmente a um degrau de cortiça mais alto que a base (ver fig. 5 B). Pele e músculos foram divulsionados. O nervo exposto foi delicadamente liberado dos tecidos adjacentes com um bisturi de vidro e conectado ao estimulador Grass S 48 (Quincy, MA, USA), que produziu estímulos indiretos, supramaximais de 3 volts, duração de 2 ms e frequência de 1 Hz (Fig. 5 C e 5 D), usando eletrodos AG-AgCl (Almeida-Silva *et al.*,2001).

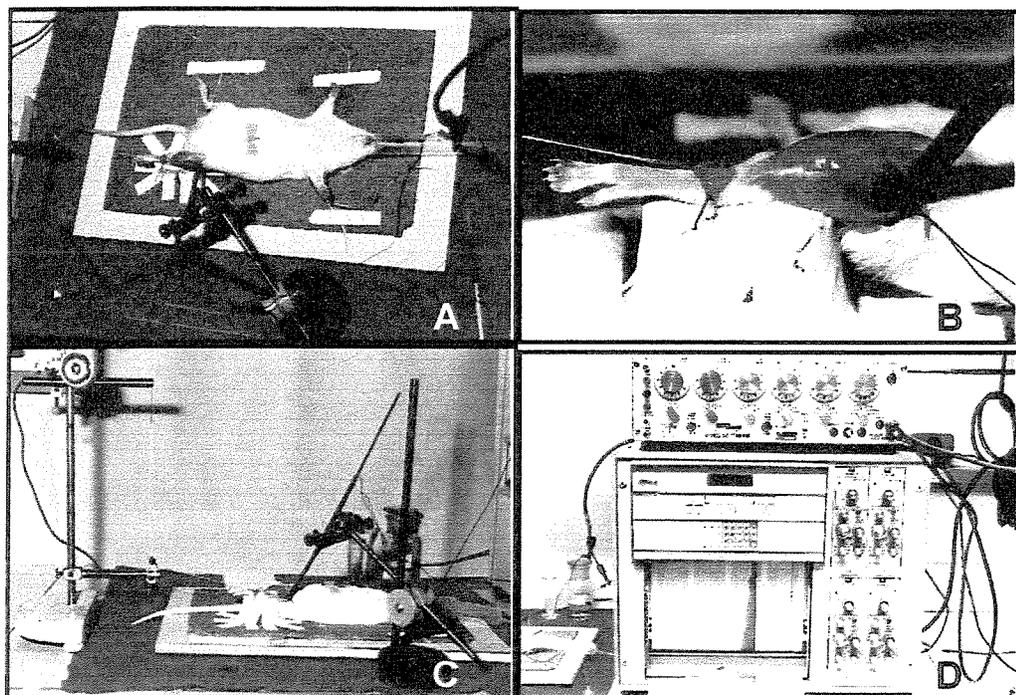


Figura 5 - A - Animal submetido ao procedimento cirúrgico - vista de cima. B - A tíbia foi fixada a uma base de cortiça mais elevada; o nervo ciático poplíteo externo foi liberado dos tecidos adjacentes e conectado ao eletrodo. C - Transdutor isométrico BG 50 g; B- Eletrodo AG-AgCl. D - Estimulador Grass S 48; B- Fisiógrafo Gould RS 3400.

3.4 Microscopia óptica

3.4.1 Análise histopatológica e morfométrica

Após o registro miográfico os músculos foram rapidamente dissecados, removidos e fixados em Bouin ou formalina 10% por um período de 24 a 48 horas. As amostras foram coletadas sempre de uma mesma região padronizada deixando a lesão no centro.

Após fixado, o material foi desidratado em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50, 70, 80, 95%) , com duração de 30 min cada, chegando até álcool absoluto (3 banhos), depois álcool absoluto + historesina (Leica Instruments GmbH, Nubloch/Heidelberg) (1:1) por 2 horas e em seguida historesina pura. A polimerização foi feita em dissecador à vácuo durante 12 horas, à 4° C, e então incluído em historesina e colocado em estufa (60°) por 24 h.

O material foi montado em blocos e cortado em micrótomo Leica RM 2035. As secções (2 µm de espessura) foram coletadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina 0,5% (Vetec, São Paulo) e Bórax 5% (Quimesp, São Paulo). Os cortes transversais e longitudinais de todas as secções obtidas dos músculos foram analisados ao microscópio fotônico Axiophot Zeiss onde se obteve fotomicrografias em cores e preto e branco com filmes Kodak Gold e Tmax, respectivamente. A avaliação quantitativa das alterações morfológicas foi feita pelo seguinte cálculo: índice de área lesada = [(soma da área das regiões lesadas : área total do corte) X 100]. As áreas foram medidas no sistema de processamento de imagens Neophot

3232 (Carl Zeiss, Esslingen, Germany) e Leica Q-500 MC (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England), sem identificação prévia de cada grupo.

3.5 Estudo para determinação do efeito dose-resposta do veneno de Bjssu na preparação neuromuscular *in vivo*.

Foram feitos vários experimentos piloto com o objetivo de padronizar a dose adequada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) para o estudo *in vivo*. Vinte e três animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Após a estabilização do registro miográfico foi administrado o veneno de Bjssu (20 μ g – n=3; 60 μ g – n=7; 180 μ g – n=7; diluído em 0,02 ml de solução salina (0,9%)), por via i.m., no terço médio do músculo tibial anterior esquerdo e o registro miográfico foi observado por mais 120 minutos (Fig. 6). As doses foram escolhidas respeitando uma progressão geométrica de razão 3.

O estudo do controle foi feito em dois grupos, da seguinte forma: um grupo denominado controle (n=3) que foi apenas submetido ao procedimento cirúrgico sem a administração de qualquer solução intramuscular e outro que foi submetido ao procedimento cirúrgico e injetado com solução salina 0,9% no terço médio do músculo tibial anterior esquerdo (n=3).

3.6 Programa de tratamento com irradiação laser HeNe

Foi usado um equipamento de laser de baixa energia HeNe (KLD, Amparo, SP,

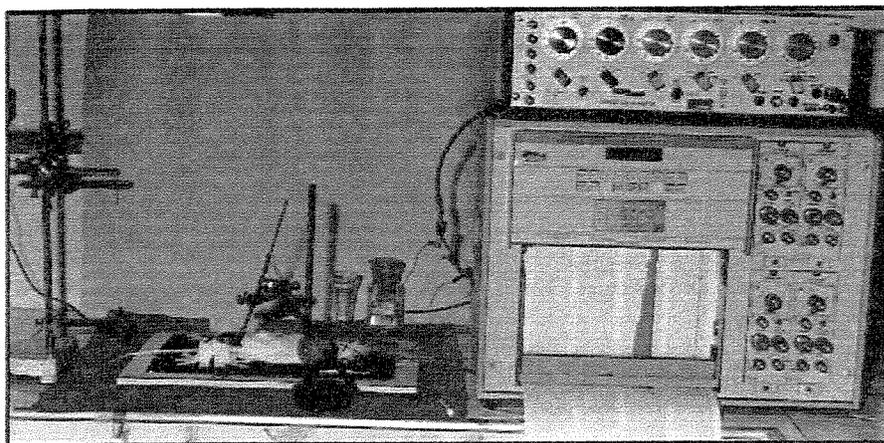


Figura 6 - Registro miográfico da preparação *in vivo*.

Brasil) (Fig. 7), $\lambda = 632.8 \text{ nm.}$, com potência de 3 mW, diâmetro do feixe de 0,8 mm e emissão contínua. O raio laser foi aplicado com um ângulo de incidência perpendicular (90°) à área onde o veneno foi injetado.



Figura 7 - Equipamento Laser de baixa energia - KLD - modelo PLASMAX IV.

A tabela abaixo mostra a dosimetria que foi usada para os diferentes grupos

experimentais tratados com laser:

DOSE	60 MIN	80 MIN	100 MIN
A	3.5 J/cm ²		
B	10.5 J/cm ²		
C	3.5 J/cm ²	3.5 J/cm ²	3.5 J/cm ²

Os grupos receberam densidades de energia diferentes (3.5 J/cm² – 9 seg; 10.5 J/cm² – 27 seg e 3.5 J/cm² – três exposições de 9 seg a cada 20 min) começando 60 min após a injeção do veneno. O efeito foi observado por 120 min (n = 5/dose). As densidades de energia da irradiação laser tiveram como base de escolha estudos que mostram que baixas doses têm sido mais adequadas para promover efeitos positivos no processo regenerativo dos tecidos que doses mais altas (Mester *et al.*, 1985 e Bibikova & Oron, 1994).

3.6.1 Descrição dos grupos experimentais

Para estudar o efeito da irradiação laser HeNe, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo dos ratos intactos (GRI), grupo com salina (GS), grupo com veneno irradiado (GVI) e grupo com veneno + laser HeNe (GVL). Os procedimentos utilizados em cada grupo e os parâmetros investigativos analisados estão descritos na tabela a seguir:

Grupos experimentais	Procedimentos por grupo	Parâmetros investigativos
Grupo dos ratos intactos (GRI)	animais intactos (controle) (não receberam injeção de veneno ou salina e não foram tratados nas três doses de laser) (n=5)	miografia histologia
	animais que não receberam injeção de veneno ou salina e foram tratados nas três doses de laser (n=5 para cada dose)	
Grupo com Salina (GS)	animais que foram injetados com salina (0,9%) e não foram tratados com laser (controle) (n=5)	miografia morfometria histologia
	animais injetados com salina e tratados nas três doses de laser (n=5 para cada dose)	
Grupo com veneno irradiado (GVI)	animais injetados com veneno (60 µg/0.02 ml) (n=5)	miografia
	animais injetados com veneno diluído (60 µg/0.02 ml) e irradiado com laser HeNe (3.5 J/cm ²) (n=5)	
Grupo com veneno + Laser HeNe (GVL)	animais injetados com veneno (60 µg/0.02 ml) (controle) (n=5)	miografia morfometria histologia CK (p/dose laser (3.5 J/cm ²))
	animais injetados com veneno (60 µg/0.02 ml) e tratados nas três doses de laser (n=5 para cada dose)	

3.7 Determinação dos níveis séricos de Creatino Quinase (CK)

Após anestesia, os animais foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo, os ratos foram injetados com 60 µg de veneno de Bjssu, no terço médio do músculo tibial anterior esquerdo e não foram irradiados com laser. No segundo grupo, os ratos foram injetados com 60 µg de veneno de Bjssu, no terço médio do músculo tibial anterior esquerdo, e submetidos à irradiação laser (3,5 J/cm²) 60 min após a injeção de veneno. As amostras de sangue (3 – 5 ml) foram colhidas por punção cardíaca antes da injeção (0 min) de veneno e após 120 min (n=5 /grupo). A atividade da creatino quinase foi dosada de acordo com as instruções do “kit” para diagnóstico enzimático Granutest® 2.5, MERCK, Darmstadt, Germany.

3.8 Análise estatística

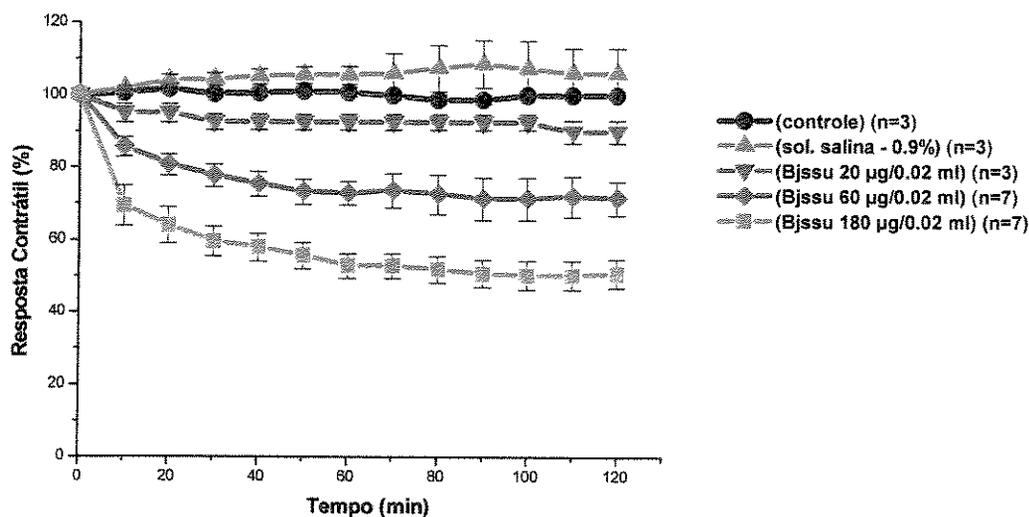
Os resultados do registro miográfico, da análise morfométrica e da determinação sérica do CK foram expressos como média \pm erro-padrão da média (SEM). A significância das diferenças que foram observadas entre os grupos controle e tratados, foi determinada utilizando-se o teste “*t*-Student” e ANOVA (pacote estatístico do *Data Analysis and Graphing Software Origin 5.0*), com valor $P < 0.05$ considerado significativo.

4 - RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudo para determinação do efeito dose-resposta do veneno de Bjssu na preparação neuromuscular *in vivo*.

Os grupos estudados (20 μg , 60 μg e 180 $\mu\text{g}/0.02$ ml de veneno de Bjssu) apresentaram diferenças significativas quanto à intensidade do bloqueio neuromuscular, em relação ao controle, e entre si ($7,6 \pm 2,1\%$, $26 \pm 3,3 \%$ e $46 \pm 4,9\%$, respectivamente) aos 60 min, e manteve-se relativamente estável até os 120 min ($10.2 \pm 3.2\%$, $30 \pm 5.2\%$ e $48 \pm 5.7\%$) (Fig. 8) Não houve diferenças significativas entre o grupo denominado controle e o grupo injetado com solução salina (0,9%) nem aos 60 min e nem aos 120 min.



Obs: as três doses de veneno são significativamente diferentes do controle e entre si em todos os pontos.

Figura 8 – Curvas dose-resposta resultantes do efeito do veneno de Bjssu sobre a força de contração muscular em preparação de rato *in vivo*. Preparações nervo ciático popliteo externo – tibial anterior, sob estimulação elétrica indireta. Diferentes concentrações de veneno foram injetadas no músculo (i.m.). Cada ponto representa a média \pm o erro padrão, $p < 0.05$ (ANOVA).

Na análise histopatológica qualitativa observou-se que o grupo que recebeu a dose de 20 $\mu\text{g}/0,02\text{ml}$ de veneno de Bjssu apresentou diferentes graus de alterações das fibras musculares, porém a maioria das fibras ainda mantiveram-se normais. No grupo que recebeu 60 $\mu\text{g}/0,02\text{ ml}$ de veneno de Bjssu observou-se que um maior número de células foi afetado, as miofibrilas degeneradas apresentaram formas de “fitas” tortuosas condensadas, resultante da sua aglutinação, foi observado também um infiltrado neutrofilico permeando as fibras. O grupo que recebeu 180 $\mu\text{g}/0,02\text{ ml}$ mostrou um maior número de células afetadas, sugerindo que quanto maior a concentração de veneno, mais extensa é a mionecrose.

Os resultados do estudo da ação do veneno *in vivo* revelaram que há uma correlação positiva entre as alterações miográficas (bloqueio neuromuscular) e morfológicas (mionecrose), e que esta depende da concentração de veneno utilizada na injeção (ver fig. 8 e 9 – A, B, C e D) e em todas elas (20 μg , 60 μg e 180 μg / 0.02 ml) a intensidade máxima do bloqueio neuromuscular foi alcançado aos 60 min após a injeção do veneno. O aspecto das alterações mionecróticas são semelhantes nas três doses de Bjssu (20 μg , 60 μg 180 μg).

4.2 Programa de tratamento com irradiação laser HeNe

Os registros miográficos dos animais dos GRI e GS não apresentaram diferenças significativas na força de contração muscular entre os que foram submetidos às diferentes densidades de energia de laser HeNe e o seu controle (Figs. 10 e 11).

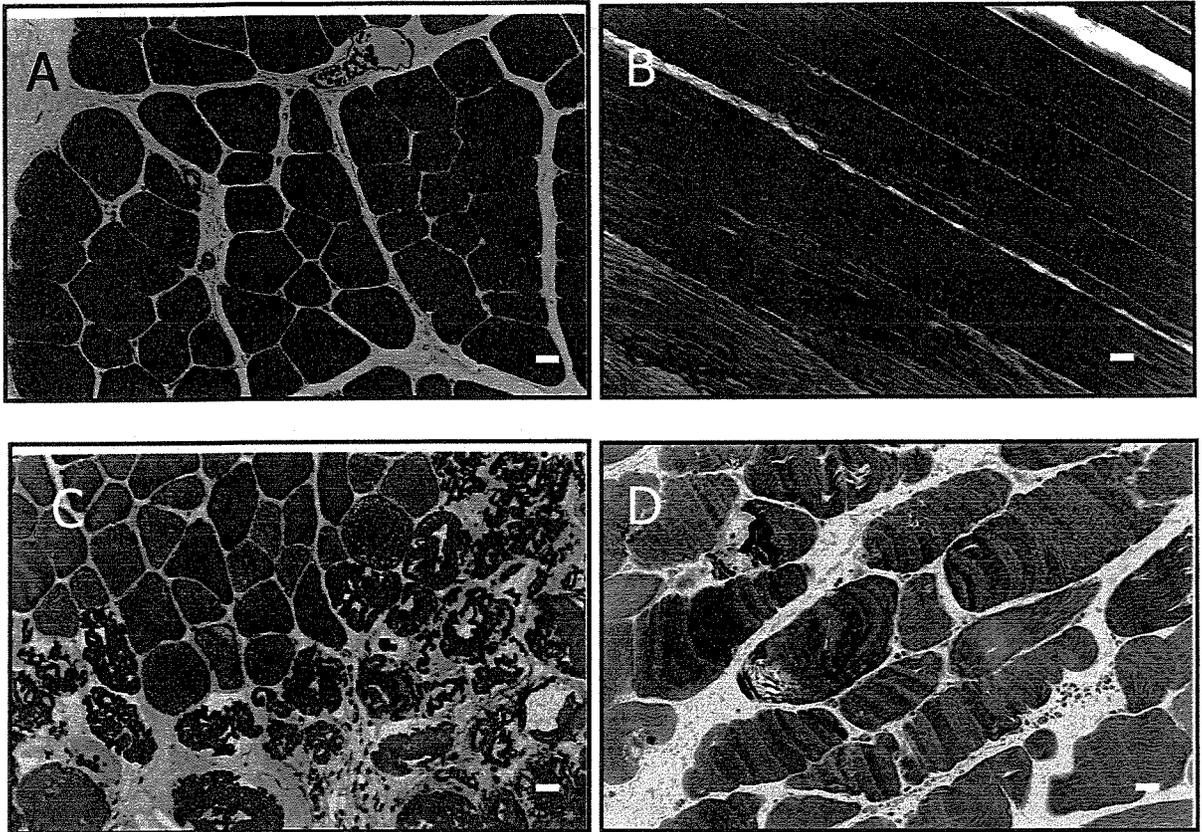


Figura 9 - Secções transversais e longitudinais do músculo tibial anterior: A-salina (transversal); B- salina (longitudinal); C- 60 µg (transversal); D - 60 µg (longitudinal). Azul de Toluidina. Barras = 30 µm.

O GVI não mostrou diferença significativa no bloqueio neuromuscular entre os animais injetados com 60 µg de veneno de Bjssu (controle) e os animais injetados com 60 µg de veneno de Bjssu irradiado com laser HeNe (3.5 J/cm^2); ou seja, veneno irradiado se comporta do mesmo modo que veneno não submetido à irradiação por laser HeNe na dose de 3.5 J/cm^2 (Fig. 12).

No GVL os resultados mostraram que a irradiação laser com densidade de energia de $3,5 \text{ J/cm}^2$ (uma única irradiação) produziu uma diminuição significativa do bloqueio neuromuscular ($11,5 \pm 2,5\%$) enquanto três irradiações (com 20 min de intervalo entre

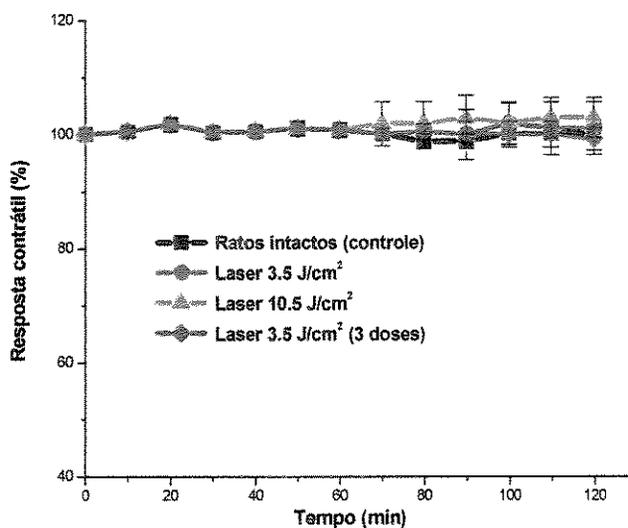


Figura 10 – Representação gráfica comparando os efeitos das três densidades de energia emitidas pela irradiação laser HeNe sobre a força de contração muscular em preparação de rato *in vivo*. Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de cinco experimentos (ANOVA).

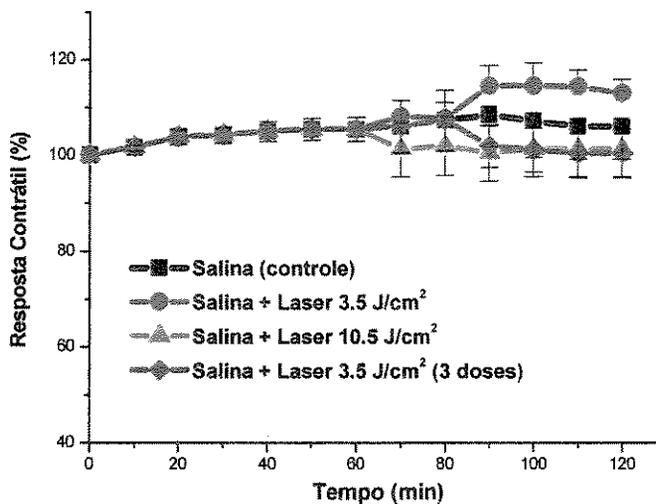


Figura 11 - Comparação dos efeitos das três densidades de energia emitidas pela irradiação laser HeNe sobre a força de contração muscular em preparação de rato *in vivo*, injetados com solução salina (0,9 %/ 0,02 ml). Cada ponto representa a média \pm S.E.M. de cinco experimentos (ANOVA).

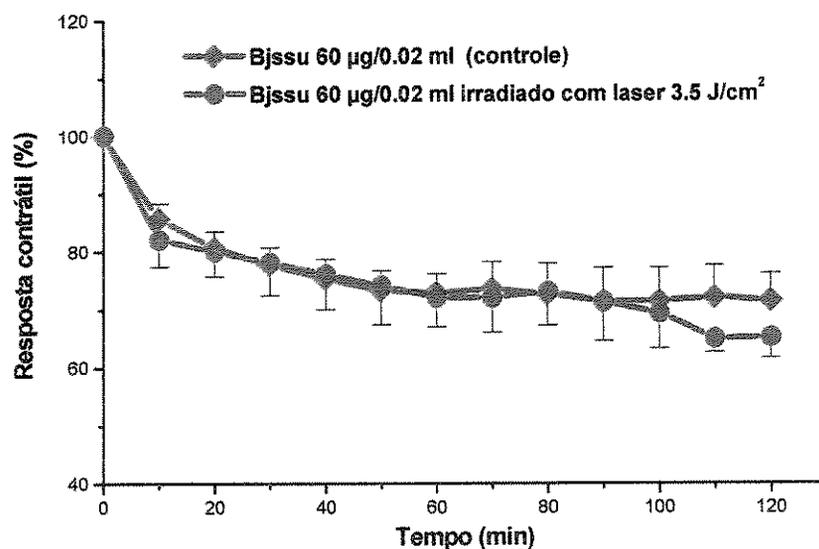


Figura 12 - Curva da resposta contrátil de preparação de rato *in vivo*, exposta à ação do veneno bruto de Bjssu (60 µg /0.02 ml) irradiado com laser HeNe (3.5 J/cm²). Cada ponto representa a média ± S.E.M. de cinco experimentos; $p < 0,05$ (ANOVA).

cada uma) não levaram a alterações significativas ($25,4 \pm 6,8\%$), em comparação com o grupo que recebeu só veneno (controle) (60 µg/0,02 ml) ($28,6 \pm 4,7\%$) num tempo de 120 min. O controle demorou 10 min e 70 min para determinar o mesmo nível de bloqueio neuromuscular obtido com as doses de 3.5 J/cm² (em dose única) e 3.5 J/cm² (três exposições), respectivamente, no tempo de 120 min. O tratamento com laser HeNe retardou o início e a intensidade do bloqueio neuromuscular nos músculos submetidos a essas densidades de energia. Apenas o grupo irradiado com 3,5 J/cm² (em dose única) revelou um aumento significativo (62%) na amplitude da resposta contrátil, começando logo aos 10 min após a irradiação ($p < 0,05$), e se mantendo estável até o fim dos 120 min. O grupo tratado com a densidade de energia de 10,5 J/cm² apresentou um nível de bloqueio neuromuscular semelhante

ao controle ($31,4 \pm 5,0\%$ vs $28,6 \pm 4,7\%$, respectivamente) (Figs. 13 e 14).

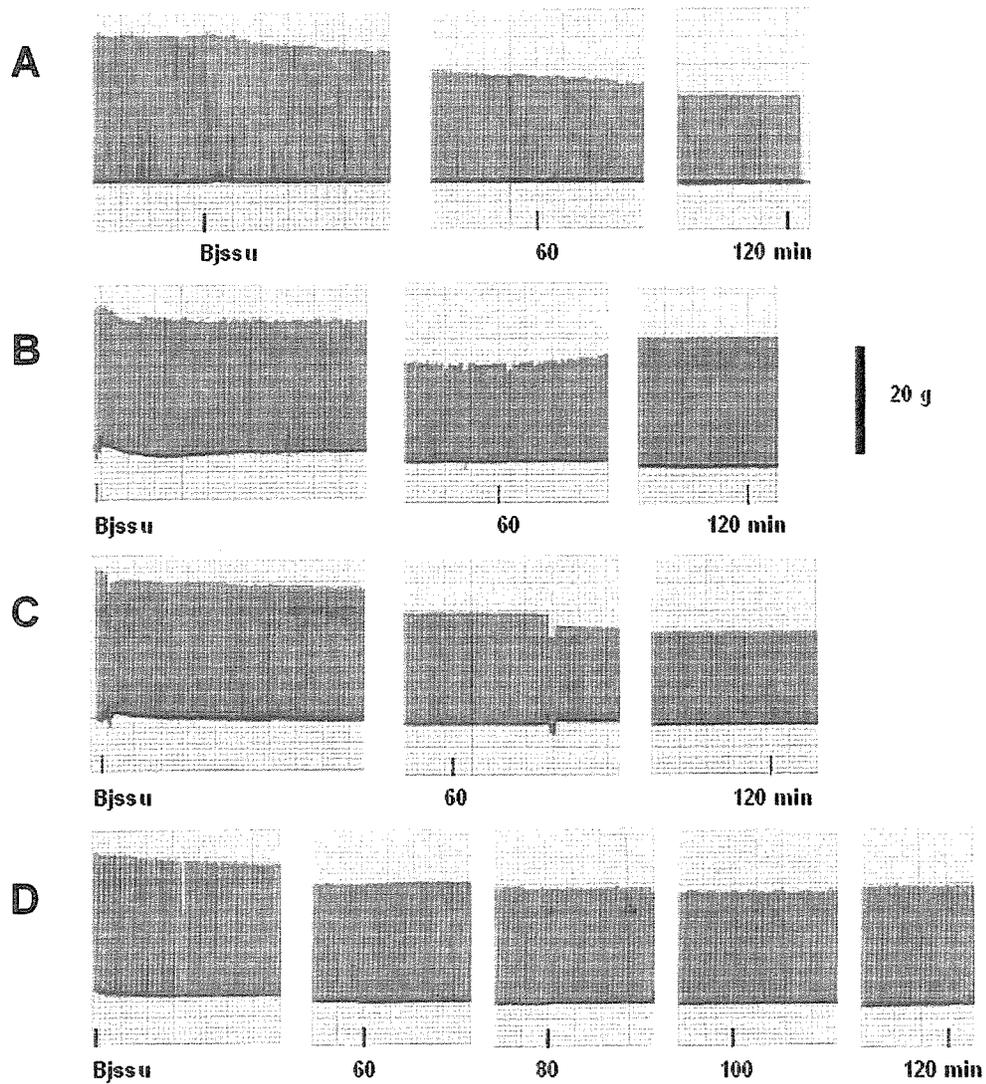


Figura 13 - Efeitos de três densidades de energia emitidas pela irradiação laser HeNe (60 min após a injeção do veneno) sobre o registro da força de contração muscular em preparação nervo ciático popliteo externo - tibial anterior (estímulo indireto). A ilustra o registro miográfico do efeito do veneno de Bjssu ($60 \mu\text{g}/0.02 \text{ ml}$); B ($3.5 \text{ J}/\text{cm}^2$), C ($10.5 \text{ J}/\text{cm}^2$) e D ($3.5 \text{ J}/\text{cm}^2 - 3$ exposições) $n=5$.

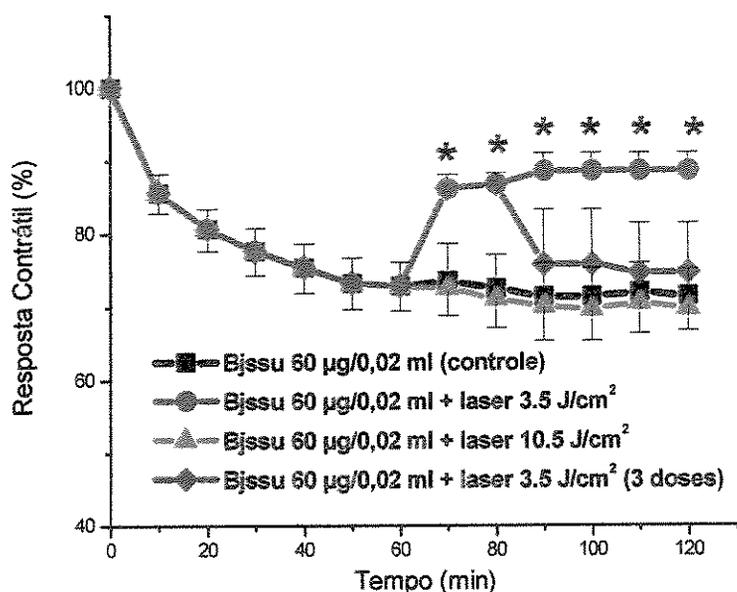


Figura 14 - Comparação dos efeitos das três densidades de energia emitidas pela irradiação laser HeNe sobre a força de contração muscular em preparação de rato *in vivo*, exposta à ação do veneno de Bjssu (60 µg /0.02 ml). Cada ponto representa a média ± S.E.M. de cinco experimentos; $p < 0.05$ (ANOVA).

Quanto à influência da irradiação laser sobre a área lesada pelo veneno, os músculos irradiados com a dose de 3,5 J/cm² (uma ou três exposições) apresentaram uma diminuição significativa na porcentagem da área lesada em comparação com o grupo controle ($15,9 \pm 1,5\%$ e $26,3 \pm 4,5\%$, respectivamente vs $44,2 \pm 5,7\%$) ($p < 0,05$). Nenhuma diferença no índice de área lesada (porcentagem de área mionecrótica) foi observada entre o grupo tratado com laser e o seu controle, quando foi aplicada a dose de 10,5 J/cm² ($36,3 \pm 4,1\%$ vs $44,2 \pm 5,7\%$) (Fig. 15).

Na análise morfológica observa-se que o grupo controle injetado com salina

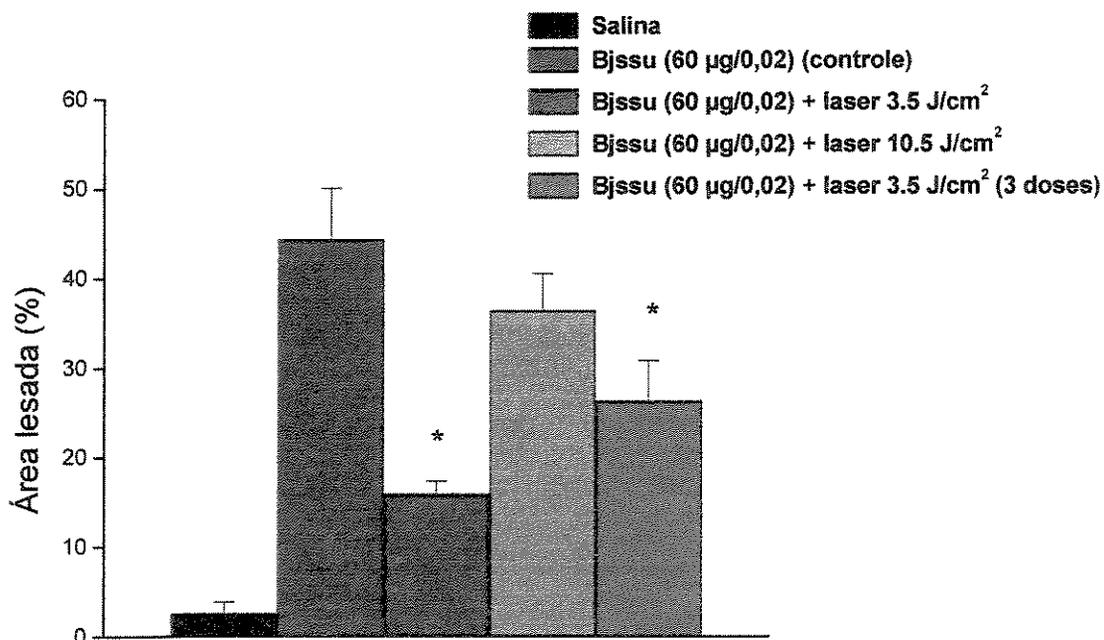


Figura 15 - Índice de área lesada: o gráfico mostra a porcentagem de área lesada do músculo tibial anterior, na preparação *in vivo*, exposta à ação do veneno de Bjssu (60 µg/0.02 ml) e irradiado com 3.5 J/cm², 10.5 J/cm², 3.5 J/cm² (três exposições) de laser HeNe; mais os grupos salina e controle. A porcentagem de área lesada na dose de 3.5 J/cm² (uma ou três exposições) foi significativamente menor em comparação com o grupo controle. Dados expressos em média ± S.E.M.; * $p < 0.05$ (ANOVA).

apresenta uma aparência normal nas secções transversais (Fig. 16A). As células apresentam um aspecto poligonal, as fibras estão organizadas e os fascículos são regulares.

As alterações mionecróticas produzidas pelo veneno parecem ser qualitativamente similares em ambos os grupos (controle e tratado com laser), mas do ponto de vista quantitativo, a extensão da área lesada foi significativamente menor no grupo tratado com laser (com exceção para a dose de 10,5 J/cm²) (Fig. 16 B).

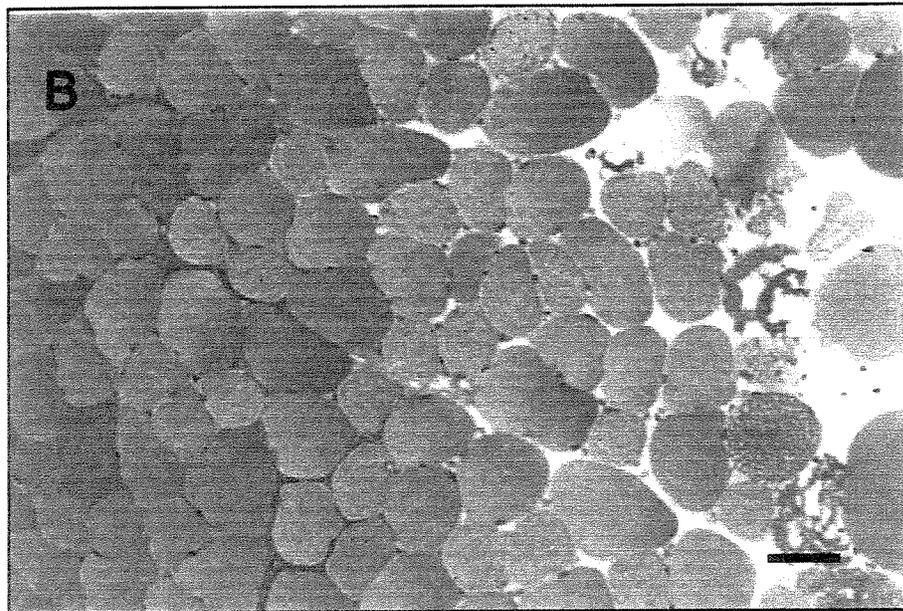
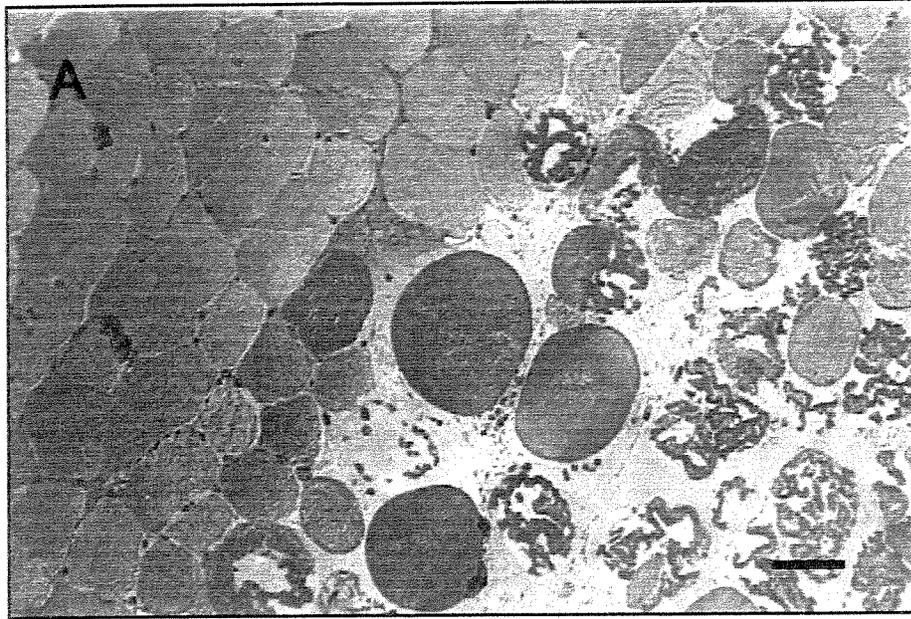


Figura 16 - Secções transversais do músculo tibial anterior: - (A) veneno de Bjssu ($60 \mu\text{g}/0.02 \text{ ml}$), (B) injetado com veneno de Bjssu ($60 \mu\text{g}/0.02 \text{ ml}$) e irradiado com laser: $3.5 \text{ J}/\text{cm}^2$. O grupo B apresenta um padrão de alterações mionecróticas similar ao grupo A. Azul de Toluidina. Barras = $30 \mu\text{m}$.

4.3 Determinação dos níveis séricos de Creatino Quinase (CK)

Os resultados revelaram uma diminuição significativa nos níveis séricos de CK no grupo irradiado com laser (3.5 J/cm^2 – uma única exposição) quando comparado com o grupo que não foi tratado com laser ($190.3 \pm 23.4\%$ vs $455 \pm 43\%$, respectivamente) ($p < 0.05$) (Fig. 17). Esses resultados corroboram a análise miográfica e morfométrica.

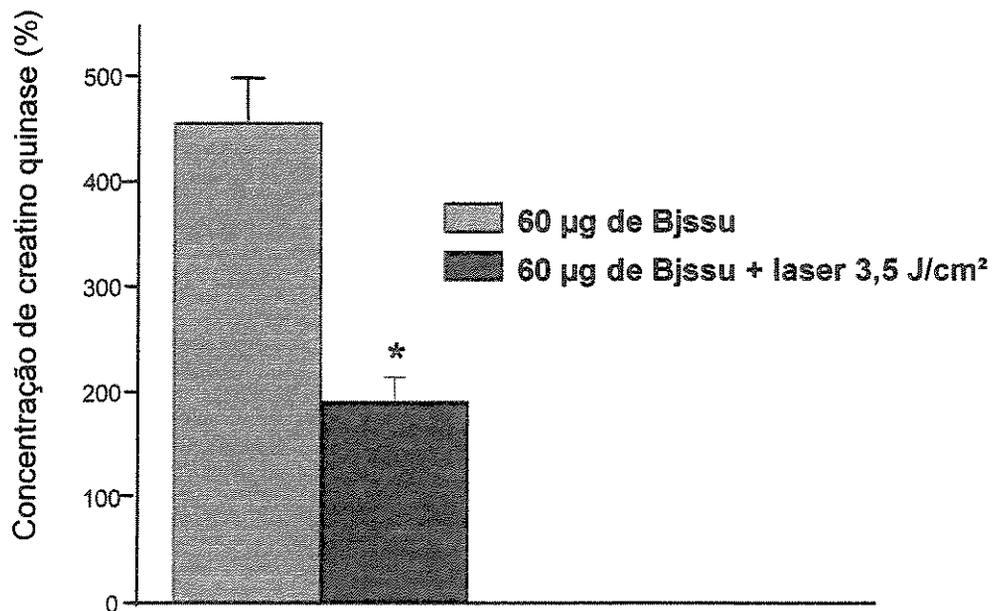


Figura 17 – Dosagem do nível sérico de CK: o gráfico mostra a porcentagem de aumento do nível sérico de CK em amostras de sangue de animais injetados no terço médio do musculo tibial anterior esquerdo com veneno de Bjssu ($60 \mu\text{g}/0.02 \text{ ml}$) e irradiado com 3.5 J/cm^2 de laser HeNe. A porcentagem de aumento do nível de CK no grupo irradiado (3.5 J/cm^2) foi significativamente menor em comparação com o grupo não irradiado. Dados expressos em média \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ (ANOVA) ($n=5$).

5 - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudo para determinação do efeito dose-resposta do veneno de Bjssu na preparação neuromuscular *in vivo*.

Os resultados que foram obtidos no estudo da ação do veneno de Bjssu na preparação neuromuscular *in vivo* mostraram que o veneno bruto de *B. jararacussu* produz uma diminuição parcial da resposta contrátil durante os primeiros 60 min, a qual permanece constante até os 120 min, ao contrário de preparações neuromusculares *in vitro* em rãs, (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983) e em camundongos (Oshima-Franco *et al.*, 2000). Essas diferenças foram consideradas como decorrentes de modelos experimentais diferentes e concentrações de veneno diferentes. No presente modelo, havia a reação do organismo do animal, enquanto no modelo *in vitro*, a interação se dá exatamente entre veneno e músculo isolado. Oshima-Franco *et al.* (2000) administrou 50 µg/ml de Bjssu na preparação neuromuscular do músculo extensor longo dos dedos (EDL) de camundongos, e observaram um bloqueio da força de contração muscular de aproximadamente 60% já aos 60 min e que mostrou-se progressivo e praticamente completo aos 120 min (83%). Esse bloqueio pode resultar, pelo menos em parte, dos efeitos da BthTX, uma miotoxina presente no veneno de *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Queiroz *et al.*, 1984, Oshima-Franco *et al.*, 2000), bem como da ação neurotóxica atribuída ao veneno (De-Souza-Queiroz *et al.*, 2002). A preparação neuromuscular de rato *in vivo* parece ser menos sensível à ação miotóxica do veneno de Bjssu pois o animal tem condições de usar mecanismos para neutralizar agressões

ao seu organismo. Na preparação *in vivo*, o bloqueio neuromuscular aos 60 min foi de 26% enquanto que na preparação neuromuscular *in vitro* o bloqueio foi de 60% aos 60 min, (para a dose de 60 µg/0.02ml na preparação *in vivo*) (Oshima-Franco *et al.*, 2000).

Na análise morfológica deste estudo, semelhantemente aos achados relatados por Oshima-Franco *et al.*, (2000), as fibras musculares apresentaram estágios mionecróticos característicos dos estágios iniciais, intermediários e avançados do envenenamento (Ownby & Colberg, 1988). A presença desses diferentes estágios de mionecrose depende da concentração da dose; ou seja, quanto maior a dose do veneno, maior a presença de estados patológicos característicos dos estágios avançados de mionecrose foram encontrados. Foram observadas diversas alterações como: lesões delta, evidências indiretas da descontinuidade do sarcolema, desorganização das miofibrilas com condensação em fitas dos miofilamentos e aparecimento de zonas desprovidas de estrutura. Essas alterações mionecróticas também foram observadas por Queiroz *et al.*, (1984) no músculo tibial anterior de camundongo inoculado com 80 µg de veneno bruto de Bjssu.

5.2 Determinação dos níveis séricos de creatino quinase

Lesões e disfunções no músculo esquelético liberam enzimas musculares na circulação e aumentam a atividade enzimática. A creatino quinase é a enzima que apresenta maior concentração no tecido muscular, e em diversas disfunções musculares mostra um índice elevado de incidência (Plebani, 2001). Estudos

demonstraram aumento dos níveis de CK no soro de animais injetados com veneno de serpentes (Mebs *et al.*, 1983; Nakada *et al.*, 1984; Cogo *et al.*, 1993).

No presente estudo foi determinado o nível de CK no grupo de animais injetados com veneno de Bjssu (60 µg/0.02ml) e no grupo de animais injetados com veneno de Bjssu (60 µg/0.02ml) e irradiados com laser HeNe na dose única de 3,5 J/cm², 9 seg, visto que essa densidade de energia apresentou alterações significativas na análise miográfica e morfométrica. Observou-se uma diminuição significativa na porcentagem de aumento do nível sérico de CK no grupo de animais irradiados com laser (190.3 ± 23.4% vs 455 ± 43%, respectivamente) (p < 0.05), o que corrobora os dados miográficos e morfométricos.

5.3 Programa de tratamento com irradiação laser HeNe

A dose de 180 µg/0,02 ml de veneno de Bjssu seria a mais indicada para o tratamento com laser, uma vez que, no acidente ofídico por *Bothrops jararacussu*, a serpente pode inocular na vítima uma grande quantidade de veneno; porém, a análise dos resultados obtidos do estudo da ação do veneno de Bjssu em preparação neuromuscular *in vivo* revelou um bloqueio neuromuscular intenso e significativo (46 ± 4,9 %) já aos 60 min e uma porcentagem elevada de área lesada (68,4 ± 4,9%). Em geral, grandes doses de veneno (> 60 µg/0,02 ml) produzem um efeito miotóxico severo impedindo a observação de outras alterações que podem ocorrer. Levando em consideração a abordagem inovadora deste estudo, a falta de referência literária neste aspecto, e o fato de a ação da irradiação laser depender, dentre outros

fatores, do estado de preservação celular (Karu, 2001), optou-se por uma dose intermediária (60 µg/0,02 ml) que permitia avaliar com maior segurança os dados obtidos. O tratamento com laser foi feito 60 min após a injeção do veneno, levando-se em consideração ser esse o tempo de bloqueio máximo alcançado nos grupos de estudo da ação do veneno de Bjsu em preparação neuromuscular *in vivo*.

No presente estudo, pode-se observar que a irradiação laser HeNe de baixa energia não produziu alterações significativas sobre a força de contração muscular em animais intactos ou que foram injetados apenas com solução salina (0,9%/0,02 ml) (GRI e GS). Observou-se também que a irradiação no local da injeção não alterou a conformação de macromoléculas do veneno, uma vez que o veneno irradiado não perdeu a toxicidade (GVI).

A literatura especializada tem revelado que o uso de irradiação por laser de baixa energia diretamente sobre tecidos, submetidos a vários agentes lesivos, tem se mostrado útil em proteger ou acelerar os processos regenerativos (Enwemeka *et al.*, 1990; Bibikova & Oron, 1993 e 1994; Nissan *et al.*, 1996; Luger *et al.*, 1998; Tatarunas *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2001; Garavello *et al.*, *in press*). Uma baixa intensidade de energia ao atingir as células de um tecido, incidirá sobre a bi-camada da membrana plasmática, e sobre a membrana das organelas celulares, principalmente as mitocôndrias. A energia dos fótons de uma radiação laser será transformada pela célula em energia química e utilizada em processos bioquímicos da função celular, principalmente na cadeia respiratória da célula, o que constituiria, segundo Karu (1989) o foto-sinal e portanto a fotobiomodulação. A

transformação de energia luminosa em energia química encontra vários exemplos tanto em organismos animais, como em vegetais (Pastore *et al.*, 1996).

Corroborando os dados da literatura, efeitos positivos da irradiação laser HeNe também foram observados no presente estudo (GVL). A densidade de energia de 3,5 J/cm² (9 seg) em apenas uma exposição promoveu uma atenuação significativa ($p < 0,05$) e imediata (10 min após o tratamento com laser) no bloqueio neuromuscular. Essa resposta rápida sobre a contração muscular pode levar à suposição de que o laser possa ter agido no terminal nervoso, modulando a sua performance, uma vez que tanto o músculo quanto o nervo foram expostos à irradiação laser (ver fig. 7). A literatura não traz uma posição consensual a respeito do efeito da irradiação laser na condutividade do nervo, enquanto alguns autores relatam efeitos benéficos (Rochkind *et al.*, 1987; Rochkind & Quaknine, 1992; Schwartz, 2002), outros encontraram um efeito inócuo na irradiação laser (Bagis *et al.*, 2002; Comelekoglu *et al.*, 2002). Entretanto, além da literatura sobre esse assunto ser escassa, tem faltado também, nesse campo, um estudo sistemático que permita uma comparação mais precisa entre modelos experimentais similares, isto é, que apresentem o mesmo tipo de laser, com comparáveis densidades de energia, comprimentos de onda e períodos de irradiação. A ausência de protocolos experimentais, ou clínicos, com parâmetros similares, tem dificultado uma avaliação congruente dos efeitos do laser.

Os benefícios da irradiação laser de baixa energia HeNe em nervos periféricos tem sido reportada em outra referência; Nissan *et al.*, (1996) observaram aumento

significante no potencial de ação do nervo ciático de ratos irradiado com laser HeNe (irradiação transcutânea - 4 a 10 J/cm²).

No presente estudo, dependendo da densidade de energia utilizada, foram encontradas três condições: um aumento notável na amplitude da resposta contrátil do músculo inoculado com veneno de Bjsu, e com uma diminuição análoga e significativa da área de lesão muscular e nível sérico de CK (dose única de 3,5 J/cm², 9 seg); uma condição na qual houve uma diminuição significativa na área muscular afetada, mas não no bloqueio neuromuscular (3 X 3,5 J/cm², 3 X 9 seg, num intervalo de 20 min cada); e finalmente uma condição na qual não foi encontrado qualquer efeito protetor pelo tratamento utilizando a irradiação laser (10,5 J/cm², 27 seg). Assim como em outros estudos (Bibikova & Oron, 1993; Amaral *et al.*, 2001) também observamos que densidades de energia baixas e em exposição única, usada como tratamento de lesões teciduais, produzem resultados mais satisfatórios, quando comparada à proteção exercida por irradiação de laser com densidade de energia mais elevada. Como já mencionado anteriormente, as doses de irradiação inferiores a 0,1 J/cm² e superiores a 10 J/cm² são ineficazes para os propósitos de bioestimulação. Além disso, há um efeito cumulativo quando há mais de uma sessão de irradiação. No presente modelo experimental, a utilização de três sessões de irradiação na dose de 3,5 J/cm², extrapola os limites bioefetivos e é uma explicação para a ineficácia do tratamento em relação à prevenção dos efeitos mionecróticos e da força contrátil do músculo.

Os dados obtidos também permitem inferir que a terapia com laser de baixa

energia HeNe é capaz de influenciar processos celulares modulando-os, como demonstrado em vários procedimentos relatados com investigação laser, como por exemplo na regeneração do músculo esquelético pós-agressão cirúrgica (Weiss & Oron, 1992; Bibikova & Oron, 1995), na neoformação de capilares durante o processo regenerativo do músculo gastrocnêmio (Bibikova *et al.*, 1994), cicatrização de tendões (Enwemeka, 1992; Reddy *et al.*, 1998), e na reparação de lesão do nervo ciático (Rochkind *et al.*, 2001). Consecutivamente ao efeito do laser sobre a cadeia respiratória das mitocôndrias na célula, Karu (1989; 2001) descreve que há aumento da força fotomotiva, do gradiente de prótons, do potencial elétrico redox, e oxidação do NADH, aumentando a relação entre sódio e hidrogênio. Isto resulta em aumento de Na⁺, K⁺ e ATPase intracelular e em seguida diminuição da concentração de H⁺. Como consequência há alterações na concentração de cálcio intracelular e do AMPc. Entretanto, a escolha da dosimetria apropriada para um programa de tratamento com laser (dose/tempo/número de exposições) que proporcione uma absorção adequada da incidência de energia pelo tecido se faz necessária para se obter um efeito fotomodulador positivo nos processos de reparação. Os mecanismos pelos quais a irradiação laser produz fotoestimulação ou fotoinibição, respectivamente acelerando ou deprimindo o processo biológico regenerativo não é perfeitamente conhecido, dada as inúmeras variáveis que estão envolvidas na interação tecido : laser .

Neste modelo experimental, como o tempo entre a inoculação do veneno de Bjsu e a aplicação da irradiação laser foi de 60 min, e foi observado em um período

restrito de 120 min, os resultados morfométricos e miográficos obtidos nesse curto espaço de tempo permitem avaliar apenas a ação preventiva e não a reparativa do laser. Pode-se especular que os efeitos do veneno sobre as fibras musculares tenha sido modulado pela radiação laser por via mitocondrial através dos fotoceptores à irradiação laser HeNe (Karu *et al.*, 1995; 2001; Pastore *et al.*, 1996; 2000; Yu *et al.*, 1997), aumentando o metabolismo oxidativo por excitação eletrônica dos componentes da cadeia respiratória, ativando o potencial elétrico da membrana, eventualmente aumentando a síntese de ATP, prolongando a ativação metabólica das fibras musculares irradiadas. No presente trabalho, a dose de 3,5 J/cm² mostrou efeitos positivos significativos sobre os parâmetros analisados (efeitos mionecróticos e função muscular através do registro miográfico) e está em conformidade com a literatura que proclama que em doses baixas a irradiação produz efeitos positivos, enquanto doses altas favorecem danos fotodinâmicos (Karu, 1989).

O presente modelo experimental não possibilita validar essa hipótese, porém, desde que a excitação de fluoróforos endógenos, principalmente os citocromos mitocondriais, pelo laser já foi demonstrado (Karu, 1989), é plausível considerar que essa via esteja envolvida, mormente o fato de ser o tecido muscular o objeto de estudo. O mecanismo exato pelo qual essa modulação ocorre é um tema que demanda futuras investigações.

6 - CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A irradiação com laser HeNe *per se* não interfere na força de contração da preparação neuromuscular de ratos normais *in vivo*.

A irradiação com laser de baixa energia HeNe na dose de (3.5 J/cm²) exerceu ação protetora no tecido muscular contra a ação miotóxica imediata induzida pelo veneno bruto de *B. jararacussu* em preparação neuromuscular de ratos *in vivo*.

Essa ação protetora foi evidenciada:

- a) mediante a eficácia em impedir a intensidade do bloqueio neuromuscular.
- b) diminuir a área de lesão muscular.

A dosagem da irradiação é um fator decisivo na modulação da resposta do músculo, podendo ser protetora (como assinalado acima), ou ser deletária (dose de 10,5 J/cm²).

O efeito de fotoestimulação ou de fotoinibição, sobre os parâmetros estudados (exceto para a determinação do nível sérico de CK, que não foi avaliado em todas as doses) depende da densidade de energia e do número de exposições.

A ação protetora da irradiação laser HeNe parece ser direta sobre os fenômenos envolvidos na função muscular e na preservação da estrutura normal do tecido, e não indireta, através de atenuação da toxicidade do veneno. Essa conclusão baseia-se no

fato de a pré-irradiação do veneno não ter afetado a sua toxicidade, como é sugerido pelos resultados da miografia com veneno *in natura* e com veneno irradiado.

A laserterapia pode ser uma ferramenta co-adjuvante, não invasiva, promissora para ser explorada na prevenção dos efeitos locais no acidente ofídico por *B. jararacussu*.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAI, M.; USUBA, M.; MAESHIMA, T.; SHIRASAKI, Y.; YASUOKA, S. - Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: an experiment with animal model. **Lasers Surg Med**, 21: 480-484,1997.
- ALMEIDA-SILVA, R. D.; LEITE, G. B.; FRANCO, Y. O.; DAL BELO, C. A.; RODRIGUES-SIMIONI, R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. - Alterações musculares causadas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* – estudo *in vivo*. **Rev. Bras. Toxicol**, 14:177, 2001.
- ALVES, A. L.; GIMENEZ, A. R.; VENTURA, D. V. R.; MORAES, F. L. B.; BELLUOMINI, H. E.; CANTER, H. M.; STACIARINI, I.; FEDERSONI JUNIOR, P. A.; SANTOS, R. Q.; LEITE, S. G. F. - **Cartilha de Ofidismo (Cobral)**. Fundação Nacional de Saúde, p.12-13, Brasília. 1996.
- AMARAL, A. C.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F. - Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**, 16:44-51, 2001.
- ANDERS, J. J.; BORKE, R. C.; WOOLERY, S. K.; VAN DE MERWE, W. P. - Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. **Lasers Surg Med**, 13:72-82, 1993.
- ARNI, R. K. ; WARD, R. J. – Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, 34: 827-841, 1996.
- BAGIS, S.; COMELEKOGLU, U.; SAHIN, G.; BUYUKAKILLI, B.; ERDOGAN, C.; KANIK, - A. Acute electrophysiologic effect of pulsed gallium-arsenide low-energy laser irradiation on configuration of compound nerve action potential and nerve excitability. **Lasers Surg Med**, 30:376-380, 2002.

- BAXTER, G. D. – **Therapeutic Lasers: Theory and Practice**. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1994.
- BIBIKOVA, A.; ORON, U. - Promotion of muscle regeneration in toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Rec**, **235**:374-380, 1993.
- BIBIKOVA, A.; ORON, U. - Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Lasers Surg Med**, **14**:355-361, 1994.
- BIBIKOVA, A.; ORON, U. - Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec**, **241**:123-128, 1995.
- BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. - Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad *Bufo viridis* by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)**, **190**:597-602, 1994.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. – **Laser na Odontologia Moderna**. 1. ed., São Paulo, Pancast, 1998, 306p.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. - The Venomous Reptiles of Latin America. **Cornell University**, New York. 1989, 425p.
- CARLSEN, R. C. ; VILLARIN, J. J. – Membrane excitability and calcium homeostasis in exercising skeletal muscle. **Am J Phys Med Rehabil**, **81**: S28-S39, 2002.
- CARPENTER, S.; KARPATI, G. – Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers. **J Neuropath Exp Neurol**, **48**: 154-170, 1989.

- CHAMBERS, R. L. ; McDERMOTT, J. C. – Molecular basis of skeletal muscle regeneration. **Can J Appl Physiol**, **21**: 155-184, 1996.
- CHARMAN, R. A. – Bioelectricity and electrotherapy – Towards a new paradigm: Part 2 Cellular reception and emission of electromagnetic signals. **Physiotherapy**, **76**: 509-516, 1990.
- COGO, J. C. ; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L – Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, **31**:1237-1247, 1993.
- COMELEKOGLU, U.; BAGIS, S.; BUYUKAKILLI, B.; SAHIN, G.; ERDOGAN, C.; KANIK, A. - Acute electrophysiological effect of pulsed gallium-arsenide low-energy laser irradiation on isolated frog sciatic nerve. **Lasers Med Sci**, **17**:62-67, 2002.
- COLLS-CRUAÑES, J. – **La Terapia Láser, Hoy**. 1ª ed. Centro Documentación Láser de Meditec, S.A. Barcelona, 1984,164p.
- DAL-BELO, C. A.; LEITE, G. B.; FONTANA, M. D.; CORRADO, A. P.; BASO, A. C. Z.; SERRA, C. S. M.; OLIVEIRA, A. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. - New evidence for a presynaptic action of prednisolone at neuromuscular junctions. **Muscle Nerve**, **26**:33-43, 2002.
- DE SOUZA-QUEIROZ, L.; MARQUES, M.; SANTO-NETO, H. - Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, **40**:1483-1486, 2002.
- ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; GALL, N. G.; WALSH, N. E. – Morphometries of collagem fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. **J Clin Laser Me Surg**, **8**: 151-156, 1990.

- ENWEMEKA, C. S. - Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to HeNe laser beam. **Tissue Cell**, **24**: 511-523, 1992.
- FEDOSEYEVA, G. E.; KARU, T.; LYAPUNOVA, T. S.; POMOSHNIKOVA, N. A.; MEISSEL, M. N. – The activation of yeast metabolism with He-Ne laser radiation – I. Protein synthesis in various cultures. **Lasers in Life Sciences**, **2**: 137-146, 1988.
- FISHER, B. D.; RENNIE, S.; WARREN, S.; MAGEE, D.; KOH, J. – The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. **J Phys Ther Sci**, **12**:49-55, 2000.
- FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. - Laser effects on osteogenesis. **Applied Surf Sci**, **154-155**:548-554, 2000.
- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. - **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes Ofídicos**. Brasília, 2001, 120p.
- GARAVELLO, I.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. - Laser photostimulation of angiogenesis in injured rat tibia. **Histol Histopathol** (in press).
- GIARELLI, S.; FAVA, G.; GRASTRONUOVO, G.; SPINOGLIO, L.; GALANTI, A. – Low-level laser therapy in osteoarticular diseases in geriatric patients. **Radiol Med**, **95**: 303-309, 1998.
- GOLDMAN, L. – Laser medicine in América: an overview. **Lasers Surg Med**, **1**:285-288, 1981.
- GRASSINO, A.; CZAIIKA, G.; HAYOT, M. – The biology of muscle damage and repair. **Arch Bronconeumol**, **36**:344-350, 2000.

- GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. – Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem Inst Butantan**, **51**: 211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. – Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, **33**:1405-1424, 1995.
- GUYTON, A. C. ; HALL, J. E – **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6^a ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1998, 639p.
- HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. – Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev**, **3**:183-211, 1990.
- HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. – The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. **Toxicon**, **39**: 1841-1846, 2001.
- HOCKBERGER, P. E. – A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochem Photobiol**, **76**: 561-79, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. – **Histologia Básica**. 9^a ed. Editora Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, 1999, 427p.
- KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I. S.; NAHAS, L. – Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Biol Res**, **19**: 199-204, 1986.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. – **Principles of Neural Science**. 3rd ed. Elsevier:New York, 1991, 35-42.
- KARU, T. – Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, **56**: 691-704, 1989.

- KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. - Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B**, 27:219-223, 1995.
- KARU, T.; AFANASYEVA, N. I.; KOLYAKOV, S. F.; PYATIBRAT, L. V.; WELSER, L. -Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by laser radiation at 633, 670, and 820 nm. **IEEE J Quantum Electron**, 6: 982-988, 2001.
- KOVACH, I. S.; ATHANASIOU, K. A. - Small-angle HeNe laser light scatter and the compressive modulus of articular cartilage. **J Orthop Res**, 15:437-441, 1997.
- LUGER E., J.; ROCHKIND S.; WOLLMAN Y.; KOGAN G.; DEKEL S. - Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, 22:97-102, 1998.
- MAZZARELLO, P.; CALLIGARO, A.; VANNINI, V.; MUSCATELLO, U. - The sarcoplasmic reticulum: its discovery and rediscovery. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4: 69-74, 2003.
- McDONAGH, A.;F. - Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. **J Perinatol**, 21:S7-S12, 2001.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. - Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, 21:393-404,1983.
- MEBS, D. ; OWNBY, C. L. - Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac Ther**, 48:223-236, 1990.
- MESTER E.; MESTER A. F.; MESTER A. - The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, 5:31-39, 1985.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. -**Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, 1998, 131p.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. – Thrombin-like and factor X-activator components of *bothrops* snake venom. **Thromb Haemost**, **41**: 314-328, 1979.
- NAKADA, K.; NAKADA, F.; ITO, E.; INOUE, F. - Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. **Toxicon**, **22**:921-930, 1984.
- NISSAN M.; ROCHKIND S.; RANZON N.; BARTAL A. - HeNe laser irradiation delivered transcutaneously: its effect on the sciatic nerve of rats. **Lasers Surg Med**, **6**:435-438, 1996.
- OSHIMA-FRANCO Y.; HYSLOP S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI L. - Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve**, **23**:1832-1839, 2000.
- OWNBY, C.; COLBERG, T. R. – Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon**, **26**: 459-474, 1988.
- PASTORE D.; DI MARTINO C.; BOSCO G.; PASSARELLA S. - Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in plant mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Mol Biol Int**, **39**:149-157, 1996.

- PASTORE, D.; GRECO, M.; PASSARELLA, S. - Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. **Int J Radiat Biol**, 76:863-870, 2000.
- PFAU, T. – Atom optics. Continuous progress on atom lasers. **Science**, 296: 2155-56, 2002.
- PLEBANI, M. - Enzymes and muscle diseases. **Reumatismo**, 53:158-165, 2001.
- QUEIROZ L. S.; SANTO-NETO H.; RODRIGUES-SIMIONI L.; PRADO-FRANCESCHI J. - Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, 22:339-346, 1984.
- RANTANEN, J.; RANNE, J.; HURME, T.; KALIMO, H. – Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. **J Neuropathol Exp Neurol**, 54: 188-194, 1995.
- REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. - Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med**, 22:281-287, 1998.
- RENAULT, V.; PIRON-HAMELIN, G.; FORESTIER, C.; DIDONNA, S.; HENTATI, F.; SAILLANT, G. – Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. **Exp Gerontol**, 35: 711-719, 2000.
- RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. - Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por *Bothrops jararaca* filhote e adulta. **Rev Hosp Clin Fac. Med. São Paulo**, 44:143-145, 1989.

- RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. - Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 32:436-442, 1990.
- ROCHKIND S.; NISSAN M.; BARR-NEA L.; RAZON N.; SCHWARTZ M.; BARTAL A. - Response of peripheral nerve to HeNe laser: experimental studies. **Lasers Surg Med**, 83:125-130, 1987.
- ROCHKIND S.; ROUSSO M.; NISSAN M.; VILLARREAL M.; BARR-NEA L.; REES DG. - Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, 9:174-182, 1989.
- ROCHKIND S.; OUAKNINE G. E. - New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). **Neurol Res**, 14:2-11, 1992.
- ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; ALON, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. - Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers Surg Med**, 28:216-219, 2001.
- RODRIGUES-SIMIONI L.; BORGESE N.; CECCARELLI B. - The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, 10: 475-489, 1983.
- SCHWARTZ F.; BRODIE C.; APPEL E.; KAZIMIRSKY G.; SHAINBERG A. - Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures. **J Photochem Photobiol B**, 66:195-200, 2002.

- SCHINDL, A.; HEINZE, G.; SCHINDL, M.; PERNERSTOFER-SCHON, H.; SCHINDL, L. – Systemic effects of low-intensity laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvasc Res**, **64**: 240-246, 2002.
- SHEFER, G.; PARTRIDGE, T. A.; HESLOP, L.; GROSS, J. G.; ORON, U.; HALEVY, O. – Low-energy irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**, **115**: 1461-1469, 2002.
- SPENCE, A. P. – **Anatomia Humana Básica**, 2^a ed. Editora Manole Ltda: São Paulo, 1991, 713p.
- STEEN, W. M. - **Laser Materials Processing**. 2^a Edition, Springer: Verlag, 1998.
- SURINCHAK J. S.; ALAGO M. L.; BELLAMY R. F.; STUCK B. E.; BELKIN M. - Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. **Lasers Surg Med**, **2**:267-274, 1983.
- TARAC, S.; STOJANOVIC, S. – Characteristics of laser light. **Med Pregl**, **52**: 29-34, 1999.
- TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. - Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GAAS (904 NM). **Acta Cir Bras**, **13**:1-12, 1998.
- TIDBALL, J. G. – Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med Sci Sports Exerc**, **27**: 1022-1032, 1995.
- VAN GERMET, M. J. C.; JACQUES, S. L.; STERENBORG, H. J. C. M.; STAR, W. M. – Skin optics. **IEEE Trans Biom Eng**, **36**: 1146-1154, 1989.
- VITAL BRAZIL O. - Peçonhas, In. Charles Edward Corbett. VI (eds): **Farmacodinâmica.**, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro 1982; p 1044-1074.

- WEISS N.; ORON U. - Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embriol**, **186**:497-503, 1992.
- WILSON, B. C.; JACQUES, S. L. – Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. **IEEE J Quantum Electron**, **26**: 2186-2199, 1990.
- YU W.; NAIM J. O.; MCGOWAN M.; IPPOLITO K.; LANZAFAME RJ. - Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol**, **66**:866-871, 1997.

8. Anexo



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 425/02 sobre "Efeitos da Irradiação por Laser nas Alterações Musculares Causadas pela Ação do Veneno de *B. jararacussu*" sob a responsabilidade de Rafael Paulo Almeida Silva e Prof. Dr. Maria Alice da Cruz-Höfling está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05/07/2002

Campinas, 05 de Julho de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 425/02 entitled "Effects of laser irradiation on the muscle alterations caused by the action of *B. jararacussu* snake venom" is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 05/07/2002

Campinas 05 de Julho de 2002.

Alba R. M. Souza Brito
Coordenadora
CEEA-IB-UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP
RUA DAS ESPERANÇAS
13081-970 CAMPINAS

TELEPHONE (019) 788 7100
FAX (019) 259 3234