

WILLIANS FERNANDO VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DE
GASTROCNÊMIOS SUBMETIDOS A MIONECROSE POR INJEÇÃO DO
VENENO DE *Bothrops jararacussu***

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO

WILLIANS FERNANDO VIEIRA

**INFLUÊNCIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REGENERAÇÃO DE
GASTROCNÊMIOS SUBMETIDOS A MIONECROSE POR INJEÇÃO DO
VENENO DE *Bothrops jararacussu***

*Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica da
Faculdade de Engenharia
Elétrica e de Computação da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
título de Mestre em
Engenharia Elétrica, na área
de Eletrônica, Microeletrônica
e Optoeletrônica.*

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
WILLIANS FERNANDO VIEIRA E ORIENTADO PELO
PROF. DR. VITOR BARANAUSKAS



Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

V673i Vieira, Willians Fernando, 1989-
 Influência do laser de baixa intensidade na regeneração de gastrocnêmios submetidos a mionecrose por injeção do veneno de *Bothrops jararacussu* / Willians Fernando Vieira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

 Orientador: Vitor Baranauskas.
 Coorientador: Maria Alice da Cruz-Höfling.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

 1. Mionecrose. 2. Espectrosocpia de laser. 3. Expressão gênica. I. Baranauskas, Vitor, 1952-. II. Cruz-Höfling, Maria Alice da, 1944-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of low-level laser therapy in muscle regeneration of gastrocnemius damaged by *Bothrops jararacussu* venom

Palavras-chave em inglês:

Myonecrosis

Laser spectroscopy

Gene expression

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Vitor Baranauskas [Orientador]

Thalita Rocha

Leandro Tiago Manera

Data de defesa: 07-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

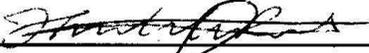
COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

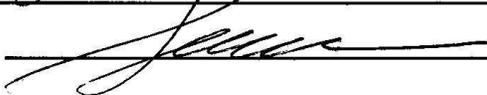
Candidato: Willians Fernando Vieira

Data da Defesa: 7 de julho de 2014

Título da Tese: "Influência do Laser de Baixa Intensidade na Regeneração de Gastrocnêmios Submetidos a Mionecrose por Injeção do Veneno de *Bothrops jararacussu*"

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente):  _____

Profa. Dra. Thalita Rocha:  _____

Prof. Dr. Leandro Tiago Manera:  _____

RESUMO

O tecido muscular é o principal afetado nos acidentes com veneno botrópico. O estudo do uso da luz, por meio da irradiação laser de baixa intensidade, busca possibilitar um recurso alternativo ao antiveneno. Camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, adultos jovens (6-8 semanas), massa corporal média de $22-25 \pm 3g$, receberam injeção intramuscular (m. gastrocnêmio direito) ($20-25\mu l$) do veneno liofilizado (diluído em NaCl 0,9%) de serpente do gênero *Bothrops jararacussu* (*Bjssu*) na concentração de 0,83mg/kg [grupos “veneno” (V), “veneno + laser” (VL) e “veneno + laser desligado”(VLP)]. Paralelamente, foi administrada injeção de NaCl 0,9% em animais dos grupos “salina” [“salina” (S), “salina + laser” (SL) e “salina + laser desligado” (SLP)]. A primeira irradiação laser (GaAs-904nm; área de tratamento: $1,0cm^2$; densidade de potência: $20 W/cm^2$; densidade de energia: $4 J/cm^2$; 4J/sessão de tratamento; modo contínuo; ponto único em contato direto; 1min 32s) foi realizada 3h pós-lesão/injeção de *Bjssu/NaCl* 0,9%, respectivamente nos grupos VL e SL. O tratamento foi repetido após 24, 48 e 72h. Desde o momento pré-lesão, os animais passaram por análise da função motora dinâmica por meio do sistema CatWalk. Terminado o período de 72h, foram sacrificados em câmara de CO₂ e o m. gastrocnêmio coletado para análise. As amostras foram processadas e submetidas a técnicas de análise histológica, PCR quantitativa, espectroscopia Raman e FT-IR. Os animais dos grupos V e VLP não realizaram apoio do membro posterior direito (mantiveram postura flexora reflexa) no período de 3h pós-lesão, diferentemente ($p<0,05$) dos grupos VL, S e SL. A função motora foi reestabelecida em 24h. Na análise histológica foi observada extensa presença de infiltrado inflamatório na região da injeção de *Bjssu*, principalmente no período de 48h, tanto para os grupos V quanto para os grupos VL. Nos grupos S e SL as características morfológicas do tecido muscular permaneceram similares ao músculo intacto. A área de lesão mionecrótica foi significativamente menor ($p<0,05$) nos grupos tratados. Foi observada expressão relativa do gene miogenina significativamente maior ($p<0,05$) no período de 72h, para o grupo VL quando comparado ao grupo V. Por meio das técnicas de espectroscopia Raman e FT-IR foi possível caracterizar o tecido muscular normal e mionecrótico, bem como a influência do laser GaAs nestes tecidos. De maneira geral, podemos considerar que o laser GaAs promoveu melhora da função motora dinâmica, reduziu a área de lesão mionecrótica e influenciou a expressão gênica no modelo de mionecrose induzida por veneno de *Bothrops jararacussu*.

ABSTRACT

Muscle tissue is primarily affected in accidents with *Bothrops* venom. The study of the use of light through the low-level laser therapy seeks to enable an alternative tool to antivenom. Males Swiss mice (6-8 weeks old), mean body mass of 22-25 ± 3g, received intramuscular injection (right gastrocnemius) (20-25µl) of lyophilized *Bothrops jararacussu* venom (*Bjssu*) at a concentration of 0.83mg/kg ["venom" (V), "venom + laser" (VL) and "venom + laser off" (VPL) groups]. Similarly, was administered 0.9% NaCl injection into "saline" groups ["saline" (S), "saline + laser" (SL) and "saline + laser off" (SLP)]. The first laser irradiation (GaAs-904nm; 1.0cm² area of treatment; 20 W/cm² power density; 4 J/cm² energy density; 4J/treatment session; continuous mode; single point; direct contact; 1min 32s) was performed 3h post-injury/injection in VL and SL groups. Laser treatment was repeated after 24, 48 and 72h. From the moment pre-injury, animals underwent for dynamic motor function analysis through the CatWalk system. After the 72h period, animals were sacrificed in a CO₂ chamber and gastrocnemius muscle collected for analysis. Samples were processed and subjected to histological analysis techniques, quantitative PCR, Raman and FTIR spectroscopy. The animals in V and VPL groups did not perform support of the right hindlimb (kept flexed in a reflex posture) 3h post-injury, unlike (p<0.05) VL, S and SL groups. Motor function was reestablished in 24h. Extensive inflammatory infiltrate in the *Bjssu* injection region was observed, mainly in the 48h period for both V and VL groups. Morphological characteristics of muscle tissue in S and SL groups remained similar to the muscle intact. The myonecrosis area was significantly lower (p <0.05) in treated groups. Relative expression of *myogenin* gene was significantly higher (p <0.05) at 72h period to VL group when compared to V group. Raman and FTIR spectroscopy techniques allowed the characterization of normal and injured muscle tissue as well the influence of GaAs laser on these tissues. In general we can consider that the GaAs laser improved the dynamic motor function, reduced the injury area and influenced gene expression in myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* venom.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Músculo esquelético	27
2.2 Miogênese embrionária	29
2.3 Lesão e regeneração muscular	33
2.3.1 <u>Miogênese no músculo adulto</u>	38
2.4 Modelos de estudo da lesão e regeneração do tecido muscular	41
2.4.1 <u>Acidente ofídico</u>	42
2.4.2 <u>Bothrops jararacussu</u>	46
2.5 Luz	48
2.5.1 <u>Interações da luz com os tecidos biológicos</u>	51
2.6 Light amplification by stimulated emission of radiation (LASER)	52
2.6.1 <u>Influência da coerência da luz</u>	58
2.6.2 <u>Fotobiomodulação</u>	60
3 OBJETIVOS	65
3.1 Geral	65
3.2 Específicos	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS	66
4.1 Animais	66
4.2 Descrição dos grupos experimentais	67
4.3 Indução da mionecrose	72
4.4 Irradiação com laser	72
4.5 Análise da função motora dinâmica	73
4.6 Coleta de material	79
4.6.1 <u>Extração de RNA total</u>	79
4.6.2 <u>Real-Time RT - qPCR</u>	81
4.6.2.1 <u>Desenho de primers específicos para ensaios de qPCR</u>	81
4.6.2.2 <u>Teste dos primers por RT – PCR</u>	82
4.6.2.3 <u>Análise de expressão gênica relativa por qPCR</u>	83

4.6.3 <u>Estudo morfológico e morfométrico</u>	85
4.6.4 <u>Espectroscopia Raman</u>	87
4.6.5 <u>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier</u>	89
4.7 Análise estatística	91
5 RESULTADOS	92
5.1 Análise da função motora dinâmica	92
5.1.1 <u>Apoio</u>	96
5.1.1.1 <i>Apoio do membro contralateral</i>	99
5.1.2 <u>Intensidade máxima</u>	101
5.1.2.1 <i>Intensidade máxima do membro contralateral</i>	105
5.1.3 <u>Balanço</u>	107
5.1.3.1 <i>Balanço do membro contralateral</i>	109
5.1.4 <u>Velocidade do balanço</u>	111
5.1.4.1 <i>Velocidade do balanço do membro contralateral</i>	113
5.1.5 <u>Comprimento da passada</u>	115
5.1.5.1 <i>Comprimento da passada do membro contralateral</i>	118
5.1.6 <u>Ciclo do passo</u>	119
5.1.6.1 <i>Ciclo do passo do membro contralateral</i>	123
5.1.7 <u>Apoio único</u>	124
5.1.7.1 <i>Apoio único do membro contralateral</i>	127
5.2 Expressão gênica	128
5.3 Estudo morfológico e morfométrico	131
5.4 Espectroscopia Raman	134
5.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ... 143	
6 DISCUSSÃO	158
7 CONCLUSÕES	177
REFERÊNCIAS	178
APÊNDICE A	195
ANEXO I	209
ANEXO II	210
ANEXO III	211

*“Ando devagar porque já tive pressa,
e levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,
só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
nada sei...”*

(Renato Teixeira)

- Aos meus pais -

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, privilégio da saúde e luz que ilumina meus passos;

Aos meus pais, por todo amor e por sempre apoiarem as minhas escolhas. Nada disso seria possível se não fosse por eles;

Ao Professor Dr. Vitor Baranauskas, por ter me recebido como seu aluno de mestrado, me concedendo a oportunidade de realizar esse sonho. Obrigado professor, por todos os seus conselhos, sua humildade e seus bons exemplos. Sua carreira acadêmica nos serve de inspiração;

À Professora Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório. Obrigado por todo carinho com que sempre me tratou, por toda credibilidade e pelo enriquecimento constante do meu trabalho;

Ao Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF) da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC – UNICAMP) pela excelência e por todo suporte de recursos (humanos e materiais) que foram tão essenciais para a realização deste trabalho;

À Secretária do DSIF, Jaqueline Bisson Ercolini Lopes, por toda sua presteza, solicitude, bom humor e pelo exemplo de profissional;

A todos os alunos do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual (DBBT), nunca imaginei que seria tão bem recebido e que sairia com novos e bons amigos. Levarei comigo um pouco de cada um;

À Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares e a seu grupo de Biologia do Desenvolvimento, por toda colaboração, pelo espaço físico e por todo suporte à realização dos meus experimentos. Sou imensamente grato;

Ao Prof. Dr. Henrique Marques de Souza por ceder-me o Laboratório de Regulação Gênica e Embrionária (LARGE) – espaço necessário para a realização dos experimentos de biologia molecular;

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA – UNICAMP), pela liofilização dos músculos; Ao Laboratório

de Espectroscopia no Infravermelho do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em especial à Profa. Dra. Kumiko Koibuchi Sakane e à Profa. Dra. Patrícia Marcondes dos Santos pelo auxílio – indispensável – na realização da técnica de FT-IR;

À Câmara de Ética e Pesquisa e ao Serviço de Estatística (FCM – UNICAMP) pelas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira por disponibilizar o equipamento CatWalk do Laboratório de Regeneração Nervosa (Departamento de Anatomia – IB/UNICAMP);

*Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), por ceder o veneno de *Bothrops jararacussu*;*

Ao Dr. Helder José Ceragioli pela fundamental colaboração nos experimentos de espectroscopia Raman e pelos constantes bons conselhos;

Agradecimento especial aos (às) colegas de laboratório: Maria Helena, Edilene, Monique, Thaísa e ao meu companheiro de bancada, Bruno Kenzo. Meu almoço no “bandejão” às 11h da manhã nunca mais será o mesmo sem vocês! Espero que sempre nos encontremos por lá... E, um salve ao meu “professor japonês”: obrigado por me ensinar cada uma das técnicas; obrigado pela sua paciência e pela sua prontidão durante a execução deste trabalho;

Às amigas Natália Roberta Santos e Letícia Hernandez, pela enorme importância que vocês tiveram em meu trabalho; à amiga Cindy Nakamura, pelas idas até Paulínia e pela constante parceria... É muito bom saber que posso contar com todas vocês;

À agência de fomento CAPES pela bolsa de mestrado; ao CNPq, FAPESP, Rede NANOBIOTEC e PROEX/CAPES pelos recursos financeiros;

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram na realização deste trabalho;

Aos camundongos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
retornará ao seu estado original.”*

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura e ultraestrutura do músculo esquelético	28
FIGURA 2 – Miogênese embrionária	31
FIGURA 3 – Fatores de regulação miogênica.....	32
FIGURA 4 – Ativação das células satélites no músculo adulto	39
FIGURA 5 – Representação esquemática da miogênese de células adultas	41
FIGURA 6 – Efeitos degenerativos da fosfolipase A_2 sobre o tecido muscular.....	45
FIGURA 7 – Serpente do gênero <i>Bothrops jararacussu</i>	46
FIGURA 8 – Espectro de radiação eletromagnético.....	49
FIGURA 9 – Combinação das flutuações dos campos elétrico e magnético.....	50
FIGURA 10 – Cavidade óptica ressonante.....	54
FIGURA 11 – Mecanismos celulares da LLLT	62
FIGURA 12 – Esquema caracterizando os períodos de tratamento com laser	72
FIGURA 13 – Sistema <i>CatWalk</i> [®] para análise da função motora dinâmica	74
FIGURA 14 – Períodos de análise da função motora dinâmica	75
FIGURA 15 – Imagem obtida inferiormente à passarela e gráficos de pressão plantar	76
FIGURA 16 – Comprimento da passada.....	77
FIGURA 17 – Ciclo do passo	78
FIGURA 18 – Técnica de extração do músculo gastrocnêmio direito	79
FIGURA 19 – Diferenças entre espalhamento elástico e inelástico	87
FIGURA 20 – Diagrama em blocos ilustrando o funcionamento de um sistema Raman de bancada	88
FIGURA 21 – Diagrama em blocos de um interferômetro do tipo <i>Michelson</i>	90
FIGURA 22 – Impressão nula da pata posterior direita (RH)	93
FIGURA 23 – Padrão de marcha normal.....	94
FIGURA 24 – Gráfico 3D mostrando intensidade nula para o membro posterior direito.....	95
FIGURA 25 – Gráfico 3D mostrando intensidade mantida no membro posterior direito.....	95

FIGURA 26 – Apoio do membro contralateral	101
FIGURA 27 – Intensidade Máxima do membro contralateral	107
FIGURA 28 – Balanço do membro posterior direito	109
FIGURA 29 – Balanço do membro contralateral	110
FIGURA 30 – Velocidade do Balanço do membro posterior direito.....	113
FIGURA 31 – Velocidade do Balanço do membro contralateral.....	114
FIGURA 32 – Comprimento da Passada do membro contralateral.....	119
FIGURA 33 – Ciclo do Passo do membro contralateral	124
FIGURA 34 – Apoio Único do membro contralateral.....	128
FIGURA 35 – Corte histológico do grupo controle	131
FIGURA 36 – Corte histológico dos grupos que receberam injeção de <i>Bjssu</i>	132
FIGURA 37 – Espectros de <i>Bjssu</i> liofilizado bruto e liofilizado e diluído	135
FIGURA 38 – Espectros médios de espalhamento Raman dos diferentes grupos .	136
FIGURA 39 – Espalhamento Raman do grupo controle.....	137
FIGURA 40 – Espalhamento Raman do grupo V48	138
FIGURA 41 – Espalhamento Raman do grupo V72	139
FIGURA 42 – Espalhamento Raman do grupo VL48	140
FIGURA 43 – Espalhamento Raman do grupo VL72	141
FIGURA 44 – Espectros médios de FT-IR dos grupos 48h em relação ao GC.....	143
FIGURA 45 – Espectros médios de FT-IR dos grupos 72h em relação ao GC.....	144
FIGURA 46 – Espectros infravermelhos do grupo controle.....	144
FIGURA 47 – Espectros infravermelhos do grupo veneno 48h.....	145
FIGURA 48 – Espectros infravermelhos do grupo veneno 72h.....	146
FIGURA 49 – Espectros infravermelhos do grupo veneno + laser 48h	147
FIGURA 50 – Espectros infravermelhos do grupo veneno + laser 72h	148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sequência de tempo e eventos durante a regeneração muscular	37
TABELA 2 – Luz laser e fonte de luz convencional	56
TABELA 3 – Caracterização dos grupos experimentais.....	67
TABELA 4 – Parâmetros de irradiação Laser.....	73
TABELA 5 – Sequências-alvo	82
TABELA 6 – Morfometria: cortes histológicos e área mionecrótica.....	133
TABELA 7 – Espalhamento Raman do grupo GC.....	137
TABELA 8 – Espalhamento Raman do grupo V48.....	138
TABELA 9 – Espalhamento Raman do grupo V72.....	139
TABELA 10 – Espalhamento Raman do grupo VL48.....	141
TABELA 11 – Espalhamento Raman do grupo VL72.....	142
TABELA 12 – Absorbância (FT-IR) do grupo GC.....	145
TABELA 13 – Absorbância (FT-IR) do grupo V48.....	146
TABELA 14 – Absorbância (FT-IR) do grupo VL48.....	147
TABELA 15 – Absorbância (FT-IR) do grupo V72.....	148
TABELA 16 – Absorbância (FT-IR) do grupo VL72.....	148
TABELA 17 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) (S).....	196
TABELA 18 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) (S) – II.....	197
TABELA 19 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) + Laser (SL).....	198
TABELA 20 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) + Laser (SL) – II.....	199
TABELA 21 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) + Laser placebo (SLP).....	200
TABELA 22 – Dados do grupo Salina (<i>NaCl</i> 0,9%) + Laser placebo (SLP) – II.....	201
TABELA 23 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) (V).....	202
TABELA 24 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) (V) – II.....	203
TABELA 25 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) + Laser (VL).....	204
TABELA 26 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) + Laser (VL) – II.....	205
TABELA 27 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) + Laser placebo (VLP).....	206
TABELA 28 – Dados do grupo Veneno (<i>Bjssu</i>) + Laser placebo (VLP) – II.....	207

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Apoio (s) do membro direito.....	96
GRÁFICO 2 – Apoio (s) para o grupo V nos diferentes períodos.....	97
GRÁFICO 3 – Apoio (s) para o grupo VLP nos diferentes períodos	97
GRÁFICO 4 – Apoio (s) para o grupo S nos diferentes períodos.....	98
GRÁFICO 5 – Apoio do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.....	99
GRÁFICO 6 – Apoio (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão...	99
GRÁFICO 7 – Apoio (s) do membro esquerdo.....	100
GRÁFICO 8 – Intensidade Máxima (u.a.) do membro direito.....	101
GRÁFICO 9 – Intensidade Máxima (u.a.) para o grupo V	102
GRÁFICO 10 – Intensidade Máxima (u.a.) para o grupo VL	103
GRÁFICO 11 – Intensidade Máxima (u.a.) para o grupo VLP.....	103
GRÁFICO 12 – Intensidade Máxima (u.a.) para o grupo S	104
GRÁFICO 13 – Intensidade máxima do membro posterior direito 3h pós-lesão.....	104
GRÁFICO 14 – Intensidade máxima do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.....	105
GRÁFICO 15 – Intensidade Máxima (u.a.) do membro esquerdo.....	106
GRÁFICO 16 – Balanço (s) do membro direito	108
GRÁFICO 17 – Balanço (s) para o grupo SL nos diferentes períodos.....	108
GRÁFICO 18 – Balanço (s) do membro esquerdo	110
GRÁFICO 19 – Velocidade do Balanço (cm/s) do membro direito.....	111
GRÁFICO 20 – Velocidade do Balanço (cm/s) para o grupo V	112
GRÁFICO 21 – Velocidade do Balanço (cm/s) para o grupo VLP.....	112
GRÁFICO 22 – Velocidade do Balanço (cm/s) do membro esquerdo.....	114
GRÁFICO 23 – Comprimento da Passada (cm) do membro direito.....	115
GRÁFICO 24 – Comprimento da Passada (cm) para o grupo V	116
GRÁFICO 25 – Comprimento da Passada (cm) para o grupo VLP.....	116
GRÁFICO 26 – Comprimento da Passada (cm) para o grupo S	117
GRÁFICO 27 – Comprimento da passada (cm) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.....	117

GRÁFICO 28 – Comprimento da passada (cm) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.....	118
GRÁFICO 29 – Comprimento da Passada (cm) do membro esquerdo.....	118
GRÁFICO 30 – Ciclo do Passo (s) do membro direito	120
GRÁFICO 31 – Ciclo do Passo (s) para o grupo V	121
GRÁFICO 32 – Ciclo do Passo (s) para o grupo VLP	121
GRÁFICO 33 – Ciclo do passo (s) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão	122
GRÁFICO 34 – Ciclo do passo (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.....	122
GRÁFICO 35 – Ciclo do Passo (s) do membro esquerdo	123
GRÁFICO 36 – Apoio Único (s) nos diferentes grupos	124
GRÁFICO 37 – Apoio Único (s) para o grupo V	125
GRÁFICO 38 – Apoio Único (s) para o grupo VLP.....	125
GRÁFICO 39 – Apoio Único (s) para o grupo VL.....	126
GRÁFICO 40 – Apoio único (s) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão	126
GRÁFICO 41 – Apoio único (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.....	127
GRÁFICO 42 – Apoio Único (s) do membro esquerdo.....	127
GRÁFICO 43 – Expressão relativa de <i>MyoD</i>	129
GRÁFICO 44 – Expressão relativa de <i>Miogenina</i>	130
GRÁFICO 45 – Expressão relativa de <i>Pax7</i>	130
GRÁFICO 46 – Percentual da área mionecrótica em relação à área total do corte histológico	134
GRÁFICO 47 – Área relativa entre as bandas 1657 e 1547 cm^{-1}	149
GRÁFICO 48 – Intensidade relativa entre as bandas 1657 e 1547 cm^{-1}	150

1 - INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos acometem cerca de 421.000 vítimas mundiais a cada ano (CORREA-NETTO *et al.*, 2010). Até o presente momento, poucos foram os estudos que avaliaram - sob diversos aspectos - o processo de reparo muscular frente ao uso de um recurso físico nos casos de lesão mionecrótica provocada por veneno de serpentes.

O tecido muscular é o principal afetado nos acidentes com veneno botrópico. As fosfolipases presentes neste tipo de veneno rompem a membrana celular e comprometem os mecanismos de produção de energia pelas células, as trocas iônicas intermembrana e a respiração celular, levando à necrose (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003; DOURADO *et al.*, 2011).

O uso de soro antiofídico é o tratamento recomendado pela OMS (1981) para os casos de envenenamento provocados por serpentes do gênero *Bothrops*. Entretanto, este recurso minimiza as consequências sistêmicas do envenenamento modulando a resposta inflamatória geral, mas não reverte a mionecrose, ou seja, não serve como estímulo ao processo de reparo muscular.

O estudo do uso da luz, por meio da irradiação laser, busca possibilitar um recurso alternativo ao até então utilizado soro antiofídico/antibotrópico. Este recurso escolhido, denominado LLLT - do inglês "*Low-Level Laser Therapy*" - é capaz de modular a extensão do processo inflamatório relacionado à lesão e reduzir e/ou prevenir a área mionecrótica consequente, concentrando os benefícios do seu uso no processo de regeneração do tecido acometido.

Baseado nessas informações, este trabalho contemplou os efeitos do laser GaAs (gálio-arseneto) em diversos aspectos da regeneração do tecido muscular (m. gastrocnêmio) de camundongos que foram submetidos à injeção do veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjssu*). As abordagens consistem nos efeitos teciduais (aspectos morfológicos e morfométricos), moleculares (expressão gênica e caracterização bioespectroscópica) e funcionais (função motora dinâmica) do laser de baixa intensidade.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo estriado esquelético

Os músculos estriados esqueléticos são propulsores do movimento humano. Quando contraído, este converte a estrutura óssea em uma potente alavanca para a cinética corporal (ARRINGTON & MILLER, 1995). Os músculos constituem o tecido mais pesado do corpo, correspondendo a 45% da massa corpórea total. É composto basicamente por fibras musculares, nervos, vasos sanguíneos e matriz extracelular e tecido conjuntivo. Estes elementos são necessários tanto para a produção de movimento articular e locomoção, quanto para o processo de reparo que ocorre após algum dano ao tecido (HUARD; LI; FU, 2002).

As fibras musculares, chamadas miofibras, são responsáveis pela função contrátil do músculo por meio da sua inervação, enquanto que o tecido conjuntivo proporciona a estrutura que mantém as fibras musculares individuais unidas durante a contração e também tem o papel de envolver os capilares e nervos (JÄRVINEN *et al.*, 2005; JÄRVINEN *et al.*, 2007; KÄÄRIAINEN *et al.*, 2000; KANNUS *et al.*, 2003).

As miofibras são formadas por uma diversidade de miofibrilas que resguardam as unidades contráteis funcionais dos músculos, os sarcômeros. Estas unidades estendem-se entre duas linhas “Z” (do alemão *zwischen*, que significa “entre”) e dispõem de miofilamentos de actina e miosina (FIGURA 1). A rede de tecido conjuntivo, por sua vez, cria um “esqueleto” de suporte para as

fibras, convertendo as forças de fibras individuais em uma resultante única (JÄRVINEN *et al.*, 2005; JÄRVINEN *et al.*, 2007; TAKALA & VIRTANEN, 2000).

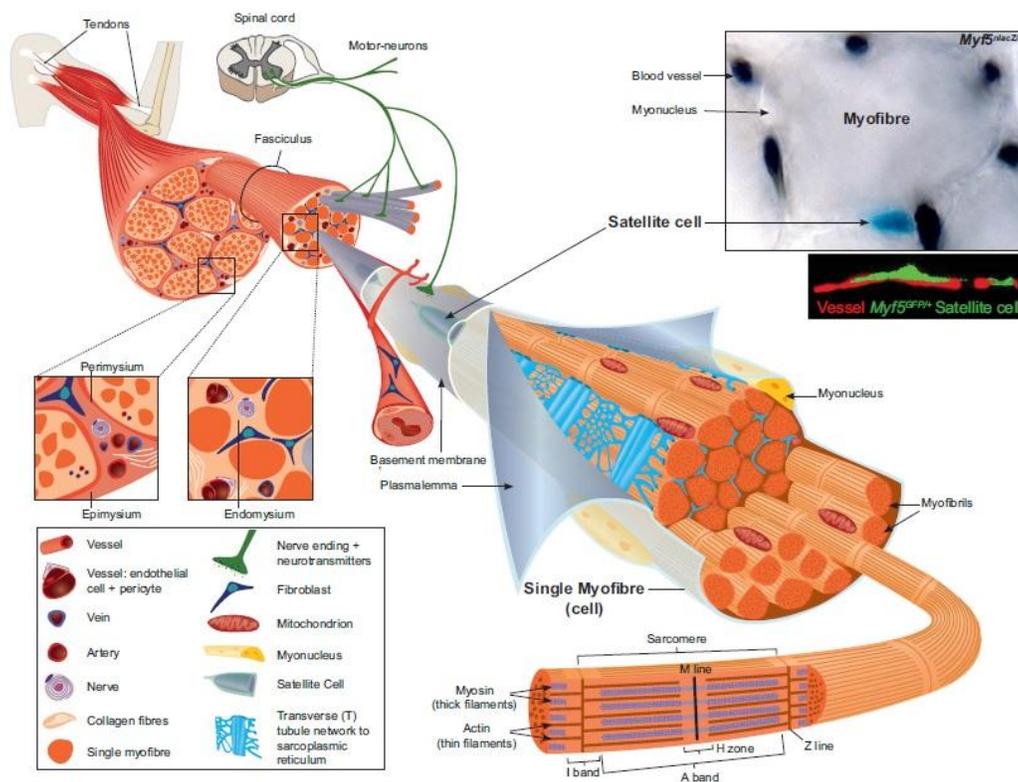


FIGURA 1 – Esquema representativo da estrutura e ultraestrutura do músculo estriado esquelético. Fonte: Adaptado de Tajbakhsh (2009).

O sarcolema consiste em uma membrana plasmática que circunda as fibras musculares individualmente, estas são envolvidas uma a uma pelo tecido conjuntivo frouxo chamado de endomísio. Os fascículos estão envolvidos pelo perimísio (tecido conjuntivo frouxo), formando a estrutura muscular como um todo, a qual está envolta por tecido conjuntivo denso, o epimísio (GHARAIBEH *et al.*, 2012).

O suporte estrutural às miofibras deve ser forte o suficiente para resistir a forças consideráveis de até uma tonelada durante carga de trabalho máxima. Para

ter resistência tão elevada, cada fibra muscular possui cadeias específicas de moléculas chamadas integrinas e complexos distrofina-glicoproteínas. Estes complexos proteicos conectam o miofilamento contrátil à matriz extracelular (MEC) por meio do sarcolema (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

De maneira geral, o músculo esquelético apresenta uma complexa formação que determina importantes funções. Para cumpri-las, os músculos apresentam uma distribuição principalmente externa pelo corpo. Dada essa “susceptibilidade”, decorrem fatores lesionais diversos que podem limitar a função muscular, até que este tecido esteja integralmente recuperado.

2.2 Miogênese embrionária

O músculo esquelético de mamíferos exibe uma grande capacidade de crescimento e reparação. Durante a embriogênese, os mioblastos são responsáveis por este fenômeno. Uma vez destinadas à linhagem miogênica, estas células proliferam-se, diferenciam-se e se fundem para formar miotubos e eventualmente as fibras musculares (SMITH; JANNEY; ALLEN, 1994).

A grande maioria dos músculos esqueléticos, exceto alguns músculos craniais e esofágicos, é formada a partir dos somitos. Estes se diferenciam ao longo do eixo dorso-ventral do embrião, originando o dermomiótomo (com localização dorsal) e o esclerótomo, localizado ventralmente. A derme e a musculatura dos membros e tronco são originadas a partir do dermomiótomo, enquanto que o esclerótomo origina a cartilagem e os ossos de vértebras e costelas (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003).

A regulação do processo de formação dos músculos esqueléticos envolve a ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas e é dependente de fatores transcricionais, conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs, do inglês “*myogenic regulatory factors*”) (CHARGÉ & RUDINICKI, 2004).

A especificação desses fatores miogênicos ocorre durante o desenvolvimento embrionário por meio de sinais positivos [Wnts, Sonic hedgehog (Shh), Noggin] e negativos (BMP4) oriundos de células das regiões circunvizinhas (notocorda, tubo neural e ectoderma dorsal) (CHARGÉ & RUDINICKI, 2004). Esses sinais ativarão os genes responsáveis por fazer com que células inespecíficas expressem um fenótipo muscular, em um processo dependente da função de fatores miogênicos transcricionais, como *Pax3* e *Pax7* (FIGURA 2) (WAGERS & CONBOY, 2005).

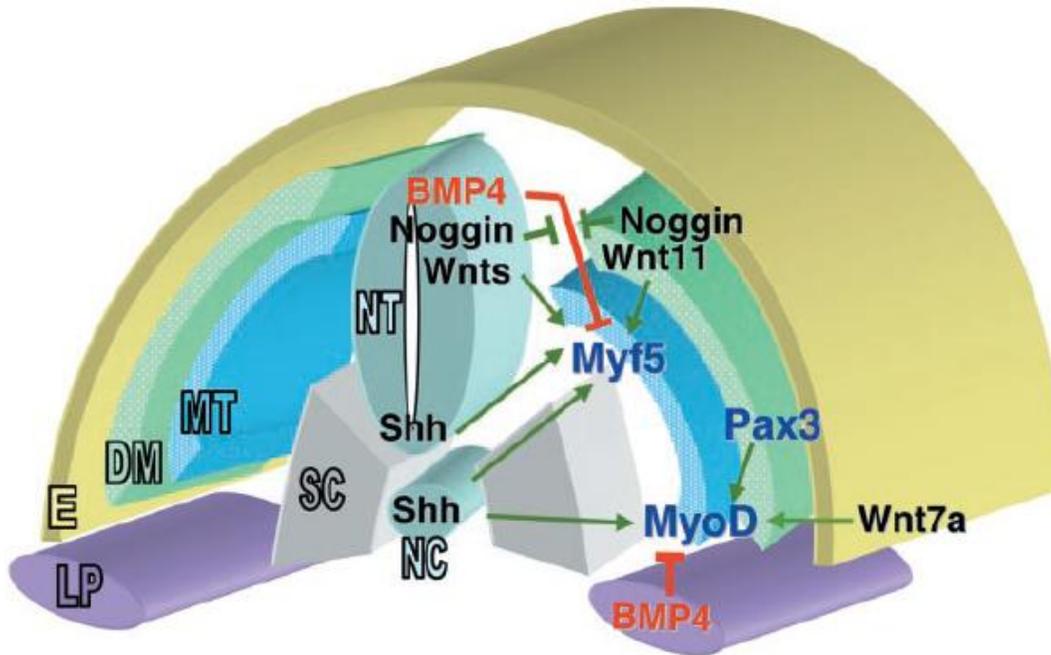


FIGURA 2 – Miogênese embrionária: células somáticas de origem mesodérmica localizadas na porção dorsal dos somitos (dermomiótomo - DM) recebem sinais dos tecidos adjacentes que induzem (*Wnts*, *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Noggin*) ou inibem a expressão dos MRFs primários e concomitantemente o fenótipo muscular. Fonte: Adaptado de Chargé & Rudinicki, 2004.

As células derivadas dos somitos migram para múltiplos sítios de miogênese embrionária, para expressar MRFs do tipo “*basic helix-loop-helix*” (bHLH), compreendendo *Myf5*, *MyoD*, *miogenina* e *MRF4* (BIRCHMEIER & BROHMANN, 2000; RICHARD-BULTEAU *et al.*, 2008) e, a partir disso, sofrem diferenciação em fibras musculares. Os progenitores miogênicos derivados dos somitos que não se diferenciam em fibras musculares neste momento – aparentemente – são destinados a ficarem “retidos” na idade adulta como células satélites musculares (WAGERS & CONBOY, 2005).

A expressão de *Pax3* nas células precursoras contribui com a miogênese. Após a ativação de *Myf5* e/ou *MyoD*, as células somáticas mesodérmicas são diferenciadas em mioblastos. A suprarregulação de MRFs secundários (*miogenina* e *MRF4*) induz a diferenciação terminal de mioblastos em miócitos, os quais se

fundem formando as miofibras multinucleadas. Uma parte das células satélites permanece associada às miofibras em um estado indiferenciado de repouso. A expressão de *Pax7* está relacionada à especificação e expansão de células satélites (FIGURA 3) (CHARGÉ & RUDINICKI, 2004).

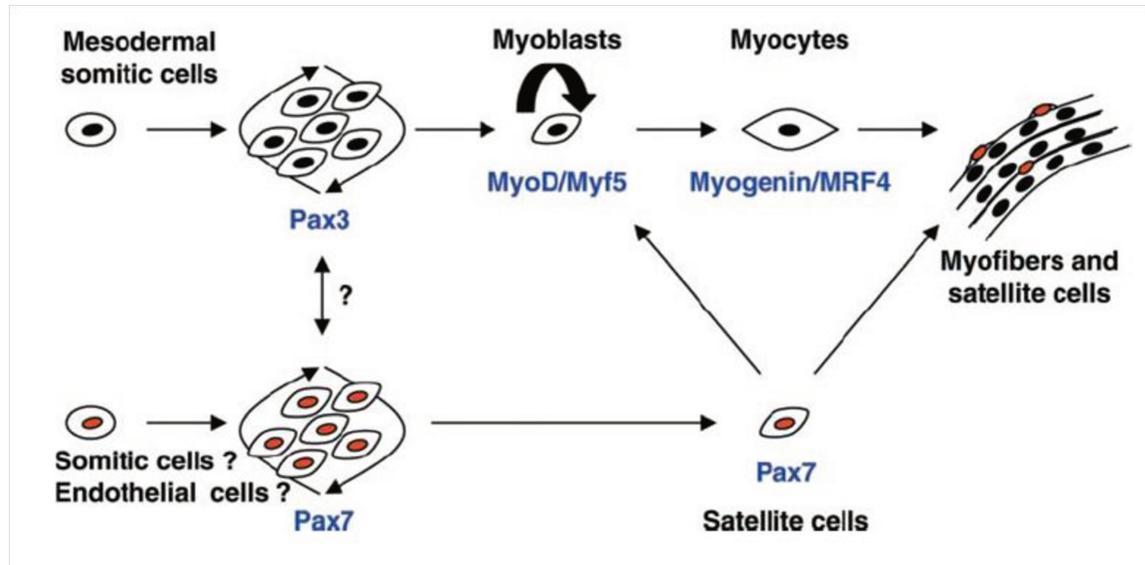


FIGURA 3 – Fatores de regulação miogênica. Fonte: Adaptado de Chargé & Rudinicki, 2004.

Os MRFs compartilham um domínio homólogo bHLH, o qual é necessário para a ligação com o DNA e para a dimerização com fatores transcripcionais da família da proteína *E*. Os heterodímeros MRF-proteína *E* e os monômeros de MRFs ligam-se a sequências de DNA (5' – CANNTG – 3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, levando à expressão dos mesmos (LASSAR *et al.*, 1991; MURRE, 1999).

2.3 Lesão e regeneração muscular

O músculo esquelético é um tecido estável. Pequenas lesões provocadas pelo contínuo funcionamento muscular promovem uma lenta renovação das fibras musculares multinucleadas. Em músculo de rato adulto, não mais que 1 a 2% do total de mionúcleos são substituídos a cada semana. Já em casos de dano grave, o tecido muscular é capaz de realizar uma rápida e extensa resposta regenerativa (CHARGÉ & RUDINICKI, 2004).

As lesões musculares são comuns nas práticas esportivas, com uma incidência variando de 10 a 55% de todos os acometimentos desse ramo. Diferentes formas de contusão, estiramento ou laceração são observadas na clínica, sendo que aproximadamente 90% de todas as lesões configuram contusões ou estiramentos (BEINER & JOKL, 2002; GARRETT, 1996; JÄRVINEN & LEHTO, 1993; ARMFIELD *et al.*, 2006).

Existem dois tipos principais de lesão muscular: a lesão por cisalhamento, na qual as miofibras, suas lâminas basais e as bainhas musculares são dilaceradas e a necrose *in situ*, em que apenas as miofibras são necrosadas dentro de sua lâmina basal intacta (JÄRVINEN *et al.*, 2005; JÄRVINEN *et al.*, 2007; KALIMO *et al.*, 1997; KÄÄRIÄINEN *et al.*, 1998).

Os músculos mais suscetíveis a lesões são aqueles classificados como biarticulares (músculos que atravessam duas articulações entre a origem e inserção dos mesmos, p. ex.: gastrocnêmio) e agem no controle e coordenação do movimento articular. Estes músculos considerados de alto-risco para lesões são compostos basicamente por fibras tipo II, sugerindo que o perfil metabólico das

miofibras é um fator determinante tanto para as características funcionais, quanto para a susceptibilidade ou risco para lesões e recidivas (TOUMI; F'GUYER; BEST, 2006). Pode-se considerar que os músculos retofemoral, gastrocnêmio e semitendinoso são os mais propícios às lesões por distensão (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

De maneira geral, as lesões musculares são caracterizadas por diversos fatores, dentre eles: ruptura de mitocôndrias e retículo sarcoplasmático, interrupção da continuidade do sarcolema, autodigestão e necrose celular, desorganização das miofibras, disfunção microvascular progressiva e inflamação (MATHEUS *et al.*, 2008).

Figurando também entre as causas de lesão e necrose do tecido muscular, é possível citar os acidentes causados por animais peçonhentos, como serpentes da família *Viperidae*. A mionecrose causada pelo veneno de serpentes está muitas vezes associada à hemorragia e edema, em um padrão complexo de dano tecidual, o qual pode ser estudado de diversas maneiras por meio do uso de miotoxinas que induzem citotoxicidade direta nas células musculares (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003).

Ao serem lesionadas, as células musculares não são substituídas por outras células. Entretanto, células satélites adicionais se multiplicam e fundem-se com as fibras danificadas, auxiliando no reparo do tecido para restabelecer a função contrátil (BORATO *et al.*, 2008).

É possível distinguir a lesão muscular de uma fratura óssea, por exemplo, pelo fato de que o músculo esquelético é curado por um processo de reparação, enquanto que o tecido ósseo sofre regeneração, no sentido de que uma vez

fraturado, o osso é substituído por tecido exatamente idêntico ao tecido original. Em lesões musculares extensas, há formação de tecido cicatricial. O processo reparativo muscular segue um padrão constante, independente da causa da lesão (contusão, estiramento/distensão, laceração ou mionecrose) (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

O processo de reparo tecidual que ocorre após a lesão muscular pode ser dividido em três fases: destruição, reparo e remodelamento. A fase de destruição é caracterizada por ruptura e necrose de fibras musculares; na fase de reparo, as células fagocíticas promovem a remoção do material necrosado e pode-se observar a reparação das miofibras; já na fase de remodelamento, os miotubos são maturados. De maneira geral, as duas últimas fases são intimamente ligadas e se sobrepõem (IWATA *et al.*, 2010).

Quando o músculo é lesionado na contusão, por exemplo, uma força mecânica excessiva estende-se através da secção transversal total de uma miofibrila, “rasgando” o sarcolema do músculo e deixando-o exposto nas extremidades da área lesionada. Quanto maior o comprimento das fibras, maiores as chances de que a necrose iniciada no local da lesão se estenda ao longo de todo seu comprimento. Entretanto, existe uma estrutura específica chamada banda de contração – uma condensação do citoesqueleto – que funciona como um sistema protetor. Poucas horas após a lesão, a propagação da necrose é interrompida pelo selamento das bandas de contração danificadas, formando uma espécie de barreira de proteção (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

Associado à ruptura das miofibrilas, os vasos sanguíneos adjacentes são também rompidos, fazendo com que as células inflamatórias circulantes no

sangue tenham acesso direto ao sítio da lesão (TIDBALL, 1995; TOUMI & BEST, 2003). O início do processo inflamatório é amplificado pela ativação de células satélites e de substâncias teciduais liberadas no local da lesão, as quais atraem quimicamente outras células inflamatórias (TIDBALL, 1995; CHAZAUD *et al.*, 2003).

Os macrófagos e fibroblastos presentes no músculo lesionado são ativados e passam a produzir sinais quimiotáticos adicionais, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Com isso, mais células inflamatórias circulantes são atraídas para o sítio da lesão. Os tecidos ainda possuem fatores de crescimento inativos que ficam armazenados na MEC até o momento em que um quadro agudo se inicie. Este armazenamento é realizado por células residentes e inativados pela forte aderência aos proteoglicanos e demais constituintes da MEC, situação que é revertida por meio da ruptura do tecido, a partir dos diversos mecanismos de lesão (JÄRVINEN *et al.*, 2005).

Kääriäinen e colaboradores (2000) apresentaram uma tabela resumida com os principais eventos durante a regeneração muscular (TABELA 1).

TABELA 1 - Sequência de tempo e eventos durante a regeneração muscular. Adaptado de KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2000.

Tempo pós-lesão	Eventos
0 - 24h	<ul style="list-style-type: none"> - retração das miofibras rompidas e “gap” preenchido com hematoma; - miofibras rompidas iniciam necrose; - migração de macrófagos; - banda de contração é formada permitindo a formação da membrana de demarcação, que impede a extensão da lesão; - ativação das células satélites em 12h; - proliferação das células satélites em 24h.
Dia 2 – 3	<ul style="list-style-type: none"> - diferenciação das células satélites em mioblastos e início da fusão em miotubos; - fagocitose de miofibras necrosadas por macrófagos; - hematoma começa a ser substituído por tecido conjuntivo.
Dia 5	<ul style="list-style-type: none"> - miotubos começam a preencher membranas basais “vazias”; - miofibras regeneradas começam a aderir ao tecido conjuntivo formado.
Dia 7	<ul style="list-style-type: none"> - miofibras regeneradas mantém-se fora das membranas; - tecido conjuntivo começa a densificar.
Dia 14	<ul style="list-style-type: none"> - formação de novas minijunções miotendíneas.
Dia 21 – 56	<ul style="list-style-type: none"> - tecido “cicatricial” começa a diminuir e as miofibras começam a entrelaçar; - fibras regeneradas maduras e mionúcleos ocupam a periferia da fibra muscular.

Há evidências de que o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) possui papel na reparação do músculo esquelético, como inibidor da atividade muscular durante a recuperação (CANNON & PIERRE, 1998; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004;

WARREN; HULDERMAN; JENSEN, 2002). Além disso, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) (ANDERSON *et al.*, 1995; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004), fatores de crescimento *insulina-like* (IGFs) (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HAYASHI; ASO; WATANABE, 2004) e, fatores transformantes do crescimento (TGF- β), além de interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) (BUNN *et al.*, 2004; CANNON & PIERRE, 1998; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004) são expressos no músculo lesionado.

Os fatores de crescimento *insulina-like* (IGFs 1 e 2) mostraram ser precursores mitogênicos para mioblastos, em lesões musculares (ENGERT; BERGLUND; ROSENTHAL, 1996), sendo responsáveis por estimular a proliferação e diferenciação de células satélites e aumentar a síntese proteica muscular (FLORINI; EWTON; COOLICAN, 1996). De maneira semelhante, Bunn e colaboradores (2004) verificaram que em lesões musculares, citocinas TNF- α e IL-1 β são quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Já as interleucinas IL-1 β e IL-6 apresentam aumento no dia 2 e TNF- α no 8º dia pós-lesão.

2.3.1 Miogênese no músculo adulto

Remanescentes do desenvolvimento embrionário, as células satélites encontram-se quiescentes entre o sarcolema e a lâmina basal das miofibras (JÄRVINEN *et al.*, 2000; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; SHI & GARRY, 2006) e quando ativadas proliferam-se, passando a ser denominadas mioblastos (RICHARD-BULTEAU *et al.*, 2008). Possuem importância no processo de

crescimento muscular normal, durante a regeneração, hipertrofia e na recuperação de condições de hipotrofia (NAKANO *et al.*, 2009). Também expressam MRFs, envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular (ARTILHEIRO *et al.*, 2012)

As células satélites foram primeiramente identificadas por Mauro, em 1961. São consideradas células mononucleadas e possuem a capacidade de se replicarem. À medida que elas se dividem, algumas permanecem como organelas, adjacentes às miofibras e a maioria delas se diferencia e se funde para formar novas miofibras, em resposta a estímulos internos e externos (JURDANA, 2008) (FIGURA 4).

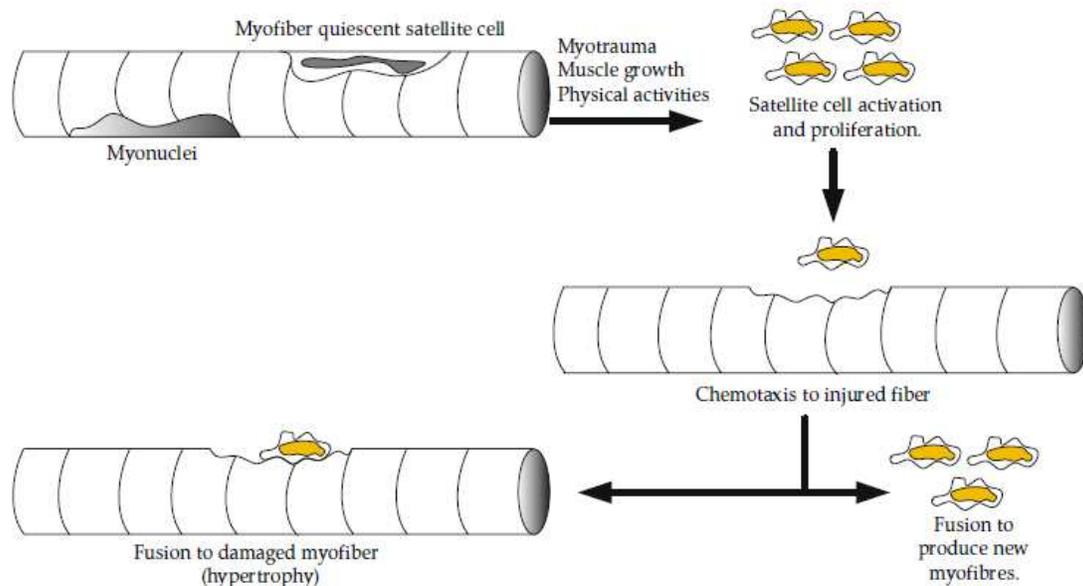


FIGURA 4 – Ativação das células satélites no músculo adulto. Estas células respondem aos estímulos provenientes de situações como: lesão muscular, crescimento e atividade física. Em resposta a estes tipos de estímulos, as células satélites são ativadas e proliferam-se. Elas migram até a região afetada e se fundem às miofibras ou então se alinham e fundem-se para produzir uma nova miofibrila. Fonte: Adaptado de Jurdana, 2008.

Assim como no desenvolvimento embrionário, os MRFs [*MyoD* (ou *Myf3*), *Myf5*, *miogenina* (ou *Myf1*) e *MRF-4* (ou *Myf6/herculina*)] têm importante papel durante a regeneração do músculo adulto, pois são críticos no estabelecimento da linhagem miogênica e no controle da diferenciação dos mioblastos e miofibras. Além disso, são responsáveis pela regulação de genes músculo-específicos como a *desmina*, *troponina I* e cadeia leve da *miosina*. (MESSA, 2008).

Alguns MRFs são expressos pela célula no processo de diferenciação. Inicialmente são expressos a *desmina*, *Myf5* e *MyoD*. Já a *miogenina*, o fator regulador de *miogenina* (*MRF4*) e a *miosina* ocorrem nos estágios mais tardios (SMITH; JANNEY; ALLEN, 1994; ARTILHEIRO *et al.*, 2012). O potencial miogênico das células satélites depende da expressão de *Pax7* e destes fatores reguladores MRF (LE GRAND & RUDNICKI, 2007).

Imediatamente após a ativação, as células satélites movem-se para fora da lâmina basal e começam a expressar *Pax7* e *MyoD*. Os mioblastos sofrem múltiplas divisões e passam a regular *Pax7*, expressar *miogenina*, se diferenciar e fundir para formar as miofibras multinucleadas (FIGURA 5). Uma parte destes mioblastos irá manter a *Pax7*, perderá a expressão de marcadores miogênicos e eventualmente deixará o ciclo celular (LE GRAND & RUDNICKI, 2007).

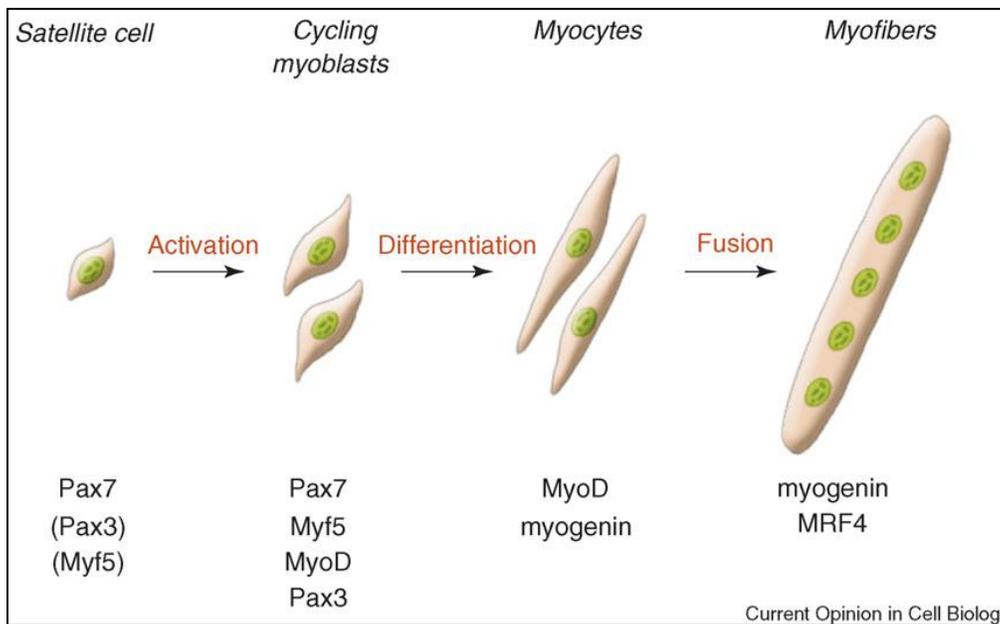


FIGURA 5 – Representação esquemática da miogênese de células adultas. Fonte: Adaptado de Le Grand & Rudnicki, 2007.

2.4 Modelos de estudo da lesão e regeneração do tecido muscular

Para demonstração do processo fisiológico da regeneração muscular, diferentes modelos de lesão experimental são induzidos em animais para favorecer uma melhor compreensão da reparação tecidual, do efeito dos recursos terapêuticos utilizados no período pós-lesão e da relação entre reparação estrutural e funcional (BOTELHO; FACIO; MINAMOTO, 2005; IWATA *et al.*, 2010).

A mionecrose, induzida por venenos ou por meio de miotoxinas [bupivacaína, cardiotoxina (CTX), notexina (NTX), entre outras fosfolipases], é um método de fácil reprodutibilidade para induzir experimentalmente o processo de regeneração muscular, mimetizando acidente ofídico.

2.4.1 Acidente ofídico

Estima-se que a incidência global de picadas por serpentes afeta cerca de 5 milhões de pessoas a cada ano. Destas, 400 mil apresentam sequelas permanentes e 125 mil vão a óbito (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013). O maior número de acidentes ofídicos na América Latina é atribuído às serpentes da família *Viperidae*, do gênero *Bothrops* (FAN & CARDOSO, 1995; GUTIÉRREZ, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2003; VOMERO; MARQUES; SANTO-NETO, 2009).

No Brasil, o envenenamento causado por serpentes é considerado um problema de saúde pública que afeta principalmente trabalhadores rurais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2010). O gênero *Bothrops* é responsável por 90% destes de acidentes (BARRAVIERA, 1993).

Ao serem injetados em humanos ou animais, os venenos botrópicos induzem um quadro fisiopatológico característico, composto por reações locais e sistêmicas. As últimas são caracterizadas principalmente por distúrbios da homeostasia, deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção do fibrinogênio, podendo gerar sangramentos em ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância (HATI *et al.*, 1999; ANDRADE, 2010; CORREA-NETTO *et al.*, 2010).

A homeostasia pode ser afetada a partir de várias proteínas com atividade enzimática presentes nos venenos botrópicos, como as fosfolipases A₂, metaloproteases e serinoproteases, as quais são responsáveis por reações como edema, hemorragia, mionecrose, atividade anticoagulante e antiplaquetária (SOARES *et al.*, 2000; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2011).

As miotoxinas são abundantes nos venenos de serpentes e podem ser divididas em três grupos: pequenas miotoxinas, cardiotoxinas e miotoxinas do tipo fosfolipase A₂ (PLA₂), sendo estas últimas divididas em subgrupos: neurotóxicas e não-neurotóxicas (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985; HARRIS & CULLEN, 1990; MEBS & OWNBY, 1990; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2011).

De maneira geral, a exacerbação do processo inflamatório resultante do envenenamento botrópico pode ser caracterizada pelo significativo recrutamento de leucócitos polimorfonucleados, seguidos por células mononucleadas. Neutrófilos são recrutados precocemente ao sítio da inflamação e desempenham um importante papel na fagocitose por meio da liberação de oxigênio reativo e nitrogênio alternadamente, além da liberação de enzimas hidrolíticas armazenadas em grânulos (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Dentre os vários efeitos causados pelas serinoproteases – principalmente relacionados às proteínas da cascata de coagulação – situam a ativação de trombina em fibrinogênio, ativação de fator V, ativação de proteína C, fibrinogénólise, ativação de plasminogênio e indução da agregação plaquetária e, em alguns outros tipos de viperídeos, ocorre ativação da atividade de calicreína e liberação de bradicinina e Lys-bradicinina, promovendo aumento da permeabilidade vascular e hipotensão (PÉREZ *et al.*, 2007).

A mionecrose é uma consequência comum após acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* como, por exemplo, a *Bothrops jararacussu*. A fosfolipase A₂ é uma miotoxina que rompe o sarcolema das fibras musculares

levando à liberação de proteínas sarcoplasmáticas e perda da homeostasia muscular (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; DOURADO *et al.*, 2011).

A partir da observação histológica e ultraestrutural, os efeitos da fosfolipase A₂ podem ser divididos em seis etapas: 1 – rompimento da membrana plasmática; 2 – formação de “lesões delta”: áreas de degeneração na periferia das fibras musculares; 3 – hipercontração dos miofilamentos; 4 – edema mitocondrial, com formação de densidades floculantes e ruptura de membranas mitocondriais; 5 – rompimento do retículo sarcoplasmático e túbulos T; 6 – picnose (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003). Adicionalmente, o influxo de Ca²⁺ desencadeia a proteólise de fibras musculares levando à degeneração (DOURADO *et al.*, 2011).

A FIGURA 6 abaixo apresenta a sequência hipotética de eventos degenerativos nas células musculares esqueléticas como consequência da ação miotóxica da fosfolipase A₂.

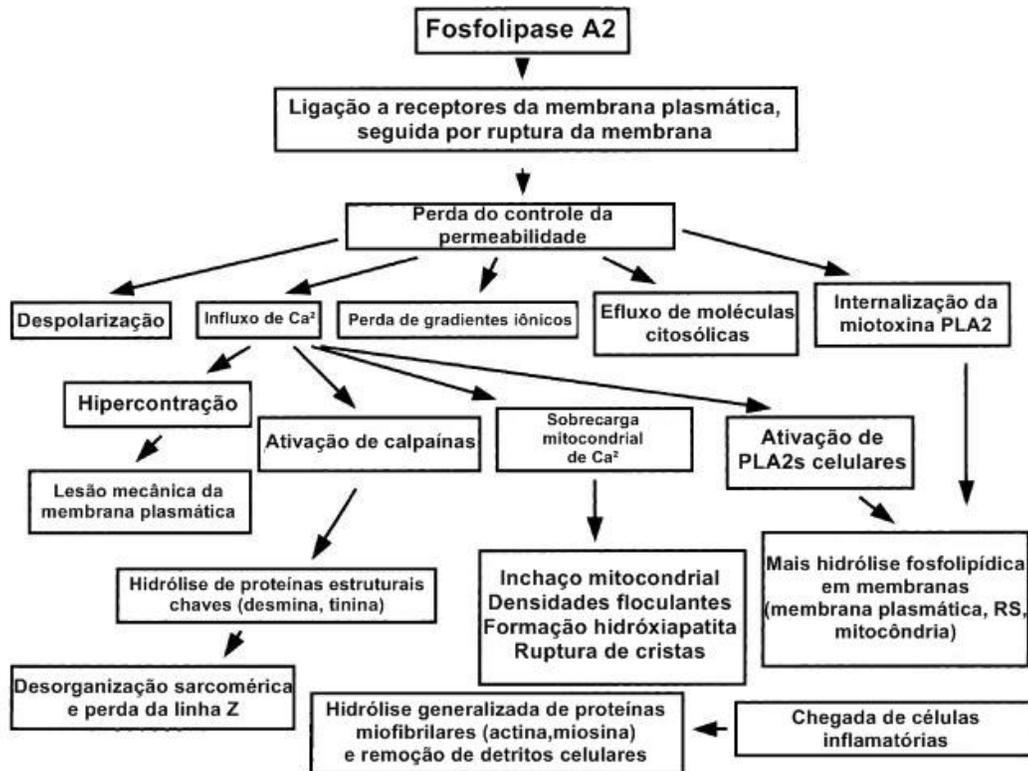


FIGURA 6 – Efeitos degenerativos da fosfolipase A₂ sobre o tecido muscular. Fonte: Adaptado de Gutiérrez & Ownby, 2003.

Há um padrão de alterações do tecido muscular exposto às miotoxinas que possui similaridades com outros tipos de patologias musculares, evidenciando a existência de um processo comum de reparação. Isso faz com que o uso de veneno de serpentes sirva de modelo para o estudo dos mecanismos patofisiológicos que ocorrem no músculo lesionado de maneira geral (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003).

A intervenção terapêutica na fase aguda do processo inflamatório causado pela lesão muscular torna-se crucial, uma vez que há intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias e exacerbada ativação de neutrófilos, que levam a maior degeneração do tecido musculoesquelético (TIDBALL & VILLALTA, 2010).

2.4.2 *Bothrops jararacussu*

Popularmente conhecida como Jararacuçu, é encontrada no Brasil, Bolívia, Paraguai e nordeste da Argentina, sendo a serpente brasileira com a maior capacidade de produção e injeção de veneno (400mg) (CORREA-NETTO *et al.*, 2010) e uma das mais importantes víboras venenosas da família dos viperídeos da América Latina, a qual pode exceder o comprimento máximo de 220cm (MILANI *et al.*, 1997) (FIGURA 7).

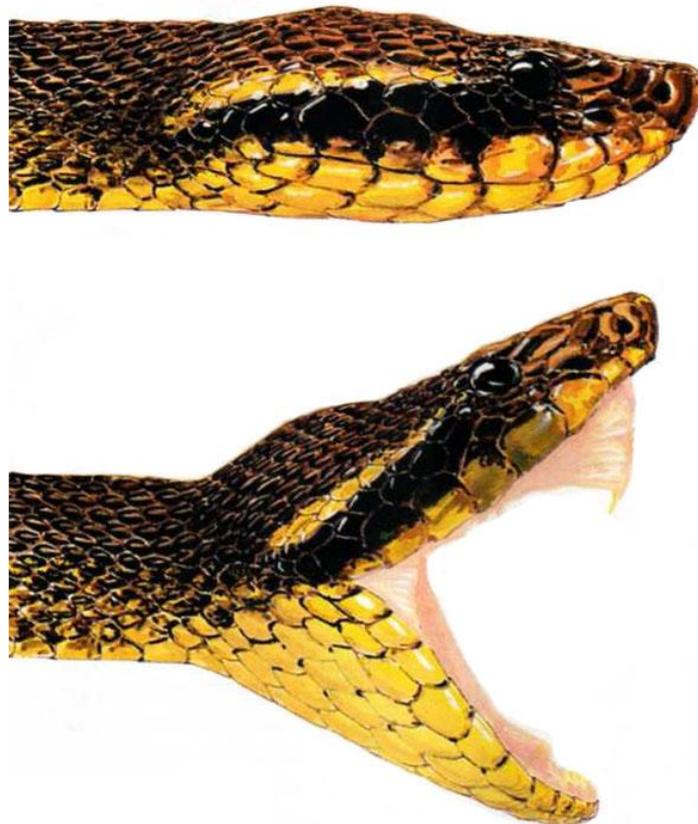


FIGURA 7 – Desenho da serpente do gênero *Bothrops jararacussu*, popularmente conhecida como Jararacuçu. Fonte: Revista Pesquisa FAPESP, Ed. 215, p. 89, 2014.

A mionecrose e a conseqüente regeneração deficiente são os principais efeitos do envenenamento por *Bothrops jararacussu* (VOMERO; MARQUES; SANTO-NETO, 2009). A alta taxa de morbidade está relacionada ao fato de que os acidentes ocorrem em áreas rurais e os primeiros-socorros à vítima demoram a ser ministrados (DOIN-SILVA *et al.*, 2009).

O veneno de *B. jararacussu* (*Bjssu*) possui duas miotoxinas principais: bothropstoxina I (fosfolipase A_2 - Lys49), sem atividade enzimática e a bothropstoxina II (PLA_2 – Asp49) com atividade catalítica (SATURNINO-OLIVEIRA *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (1981), o tratamento mais indicado para envenenamentos por *Bjssu* é a soroterapia. No entanto, a efetividade do soro na neutralização deste tipo de veneno tem sido foco de discussão por diversos autores (DIAS-SILVA *et al.*, 1989; MOURA-SILVA *et al.*, 1990; ROODT *et al.*, 1998; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2001; ZAMUNÉR *et al.*, 2004; BEGHINI *et al.*, 2005), uma vez que há relatos de casos em que este tipo de terapia não foi efetivo quando utilizado isoladamente (CORREA-NETTO *et al.*, 2009).

A soroterapia não reverte a mionecrose, apenas evita sua evolução e controla o processo inflamatório quando o antiveneno é aplicado de maneira precoce (BARBOSA *et al.*, 2008). A gravidade dos efeitos locais tem importância clínica significativa, levando à busca de recursos terapêuticos capazes de minimizar e/ou prevenir a exacerbação da lesão por envenenamento (DOIN-SILVA *et al.*, 2009).

Alguns autores buscaram outras formas de intervenção para o tratamento das lesões causadas por envenenamento botrópico e, dentre estes recursos alternativos ao soro antibotrópico/antibotrópico-laquétrico, houve destaque para o uso da luz como fonte de terapia, geralmente modulada por equipamentos emissores de laser de baixa intensidade (DOURADO *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2008; DOIN-SILVA *et al.*, 2009).

2.5 Luz

A luz é parte do espectro de radiação eletromagnético (FIGURA 8), que varia das ondas de rádio até os raios gama. De acordo com as equações de Maxwell, a luz possui amplitude (determina o brilho), comprimento de onda (determina a cor) e polarização. O comprimento de onda (λ) é definido como a largura de uma oscilação completa da onda. De acordo com a teoria quântica, o espectro eletromagnético consiste de partículas chamadas fótons, que são “pacotes” de energia que se movem na velocidade da luz. O brilho desta deve-se ao número de fótons e a cor à energia contida em cada um dos fótons (CHUNG *et al.*, 2011).

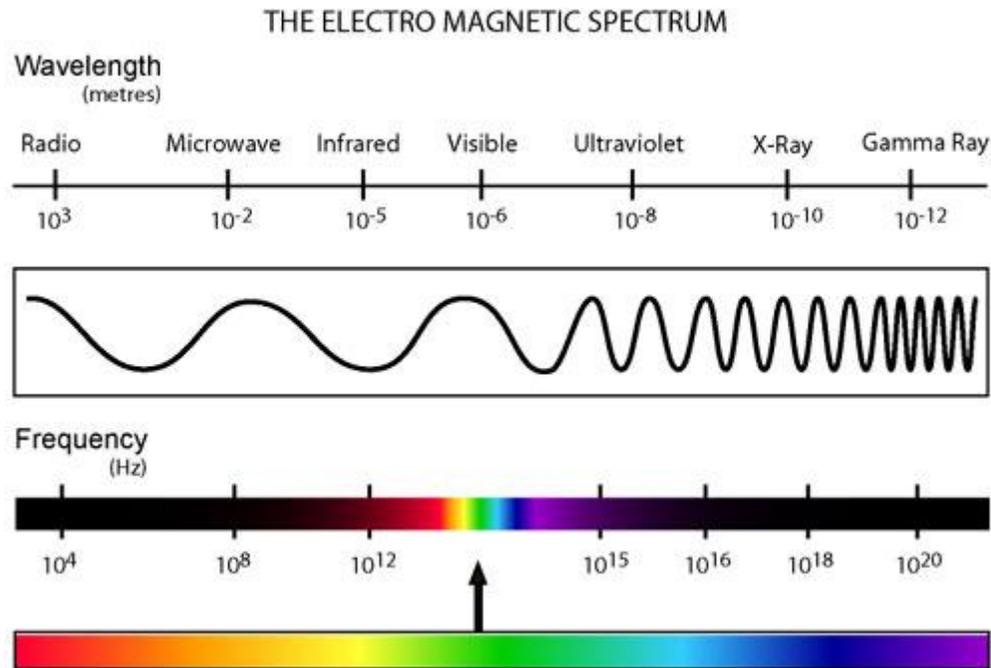


FIGURA 8 – Espectro de radiação eletromagnético: das ondas de rádio até os raios gama. Na figura, destaque para a região visível do espectro. Quanto maior a frequência, menor o comprimento de onda (λ). Fonte: <http://zebu.uoregon.edu/~imamura/122/lecture-2/em.html>.

O espectro eletromagnético contém comprimentos de onda cada vez menores quanto maior a frequência. A relação entre a frequência e o comprimento de onda pode ser resumida no espaço livre pela equação:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

onde λ é o comprimento de onda [em metros (m)], c é a velocidade da luz [em metros por segundos (m/s)] e f é a frequência [em Hertz (Hz)].

Duas teorias são empregadas no estudo das propriedades da luz: a ondulatória (teoria de *Maxwell*) e a quântica (*Planck*). A combinação das flutuações dos campos elétrico e magnético ocorre de forma perpendicular à propagação da radiação (FIGURA 9).

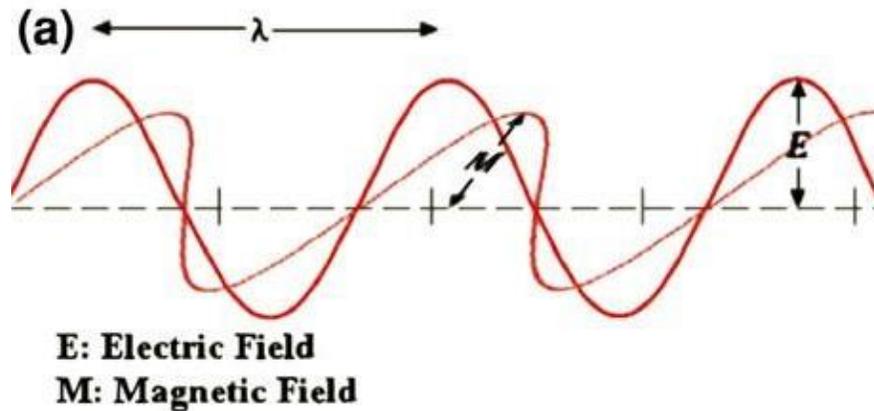


FIGURA 9 – Combinação das flutuações dos campos elétrico e magnético de forma perpendicular à propagação da radiação. Fonte: Adaptado de Chung *et al.*, 2011.

De acordo com Planck e Einstein, a onda transporta “*quanta*” de energia, que corresponde a pacotes de fótons. Os fótons de um determinado comprimento de onda têm uma energia quantal discreta e invariável, que pode ser calculada pela frequência inerente (f) e a constante de *Planck* (h), de acordo com a equação:

$$E = hf \quad (2)$$

onde E é a energia do fóton [em *Joule* (J)]. Dado que o comprimento de onda e a frequência são relacionados no espaço livre (equação 1), pode-se estabelecer:

$$E = hc/\lambda \quad (3)$$

onde E é a energia do fóton (J); h é a constante de Planck; c é a velocidade da luz (m/s); λ é o comprimento de onda (m). De acordo com as equações apresentadas, é possível observar que associados aos menores comprimentos de onda da luz, estão fótons carregando maiores quantidades de energia.

2.5.1 Interações da luz com os tecidos biológicos

Desde as primeiras civilizações, as propriedades da luz têm sido empregadas em procedimentos de diagnóstico e terapia de condições patológicas. Gregos e romanos faziam uso de banhos de sol, por isso possuíam solários em casa. Os egípcios utilizavam a luz solar para aplicações terapêuticas em afecções da pele (KATZIR, 1993).

Quando a luz atinge o tecido biológico, parte dela é absorvida, parte é refletida ou dispersada e parte é transmitida. Uma porção da luz é refletida por mudança no ar e no índice de refração do tecido, como é afirmado pela lei de *Snellius*:

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{n_1}{n_2} \quad (4)$$

onde θ_1 é o ângulo entre a luz e a superfície do ar, θ_2 é o ângulo entre o raio e a superfície do tecido, n_1 é o índice de refração do ar e n_2 , o índice de refração do tecido.

Quanto à porção da luz que é absorvida pelo tecido, os estados de energia são quantizados. No entanto, a absorção de um fóton ocorre apenas quando sua energia corresponde à diferença de energia entre estes estados quantizados. É por conta da absorção que os efeitos desejados ocorrem sobre os tecidos (CHUNG *et al.*, 2011).

2.6 Light amplification by stimulated emission of radiation (LASER)

LASER é o acrônimo para o termo em inglês “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*” (em português: “*amplificação de luz por emissão estimulada de radiação*”), que reúne diversos dispositivos capazes de emitir radiação eletromagnética em diversas faixas espectrais, variando desde os raios X até os raios gama. A radiação laser é caracterizada por alta monocromaticidade, coerência espacial e polarização, de modo que utiliza a luz emitida por um átomo ou molécula para estimular a emissão de luz por mais átomos ou moléculas, amplificando a luz original.

Um diodo laser semiconductor consiste em uma junção *p-n* combinada com uma cavidade óptica ressonante. O diodo formado pela junção *p-n* é operado com polarização direta. Os portadores injetados se recombinam na junção *p-n* emitindo fótons. Se a densidade de portadores na junção *p-n* ultrapassa um determinado valor limiar, a luz gerada será amplificada e finalmente dará emissão no laser (ROSSI, 1994).

Fisicamente, um átomo é composto por um núcleo carregado com carga positiva, o qual é orbitado por elétrons carregados negativamente, que se posicionam em níveis de energia bem definidos (orbitais). Apenas um determinado número de elétrons pode ocupar um dado nível de energia e nenhuma forma de radiação acontece quando os elétrons mantêm-se em seus 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 (TARAC & STOJANOVIC, 1999).

Ao receber energia térmica ou elétrica, o elétron pode saltar para a camada mais externa (mais energética), deixando o átomo instável – que retém essa energia em fração de segundo – voltando em seguida para seu estado de repouso (estado estável). Nesta transição ocorre a liberação de energia sob a forma de fótons de luz. Quando o número de átomos em estado excitado for maior que aqueles em estado fundamental (situação conhecida como *inversão de população*), a intensidade do feixe luminoso será aumentado, caracterizando a amplificação de radiação (TARAC & STOJANOVIC, 1999).

A cavidade laser (também chamada de *Perot-Fabry*) é uma câmara que varia de tamanho dependendo do meio ativo com o qual é formada e da potência do aparelho. Geralmente, possui formato cilíndrico com dois espelhos posicionados em suas extremidades, sendo um deles totalmente refletivo (100%) e o outro parcialmente refletivo (99%), contendo um orifício pelo qual o raio laser é liberado (FIGURA 10) (BRUGNERA & PINHEIRO, 1998).

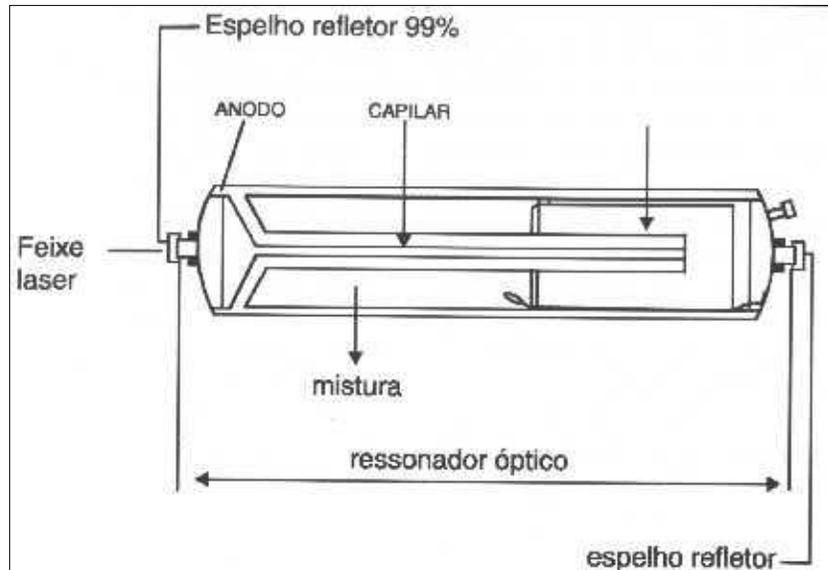


FIGURA 10 – Cavidade óptica ressonante. O tamanho e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo (gasoso, líquido, semicondutores, excímeros, químicos e cristais). Fonte: <http://www.forp.usp.br/restauradora/laser/fisica.html>

O raio luminoso sai da cavidade do dispositivo laser com uma determinada concentração de luz. A potência da fonte luminosa dividida pela área de emissão é chamada densidade de potência (DP) ou irradiância ($DP = W/cm^2$). Ao multiplicar a irradiância pelo tempo de exposição (em segundos), obtêm-se a densidade de energia (DE) ou fluência (em J/cm^2). Assim, é possível descrever a DE como a quantidade de energia (J) concentrada em uma determinada superfície ($DE = J/cm^2$).

Katzir (1993) descreve o laser por meio de algumas características intrínsecas básicas:

1 – *Monocromaticidade*: uma única cor é observada na emissão da luz laser. Cores puras não são normalmente observadas na natureza. A luz de uma lâmpada ou a luz do sol que passa através de um filtro de vidro produz uma cor correspondente a uma variedade de comprimentos de onda. No entanto, a luz

originada é menos “pura” em comparação ao laser. Este emite apenas luz monocromática com toda energia concentrada em um único comprimento de onda;

2 – *Colimação*: a luz laser é emitida em um feixe que é bastante estreito e assim permanece. Essa propriedade torna possível projetar um feixe de laser da Terra até a lua com pouquíssima divergência. Para muitas propostas práticas, é tratado como um feixe paralelo;

3 – *Potência*: a potência emitida por lasers pode ser bem alta. Por exemplo, a potência de saída (*output*) normalmente utilizada em um feixe de laser cirúrgico pode chegar a 100W ou mais;

4 – *Coerência*: o feixe de laser colimado consiste de ondas de uma cor, isto é, ondas de mesmo comprimento. O termo coerência é usado por físicos para expressar o grau de monocromaticidade e colimação. Todas as ondas em um feixe de laser são altamente ordenadas no espaço e correlacionadas no tempo¹;

5 – *Densidade de energia*: a radiação laser é concentrada em uma caneta com área de poucos milímetros. Entretanto, o feixe pode ser focalizado em um *spot* com diâmetro da ordem do comprimento de onda do laser. A densidade de energia focal do *spot* pode ser extremamente alta, com magnitude muitas ordens superiores, quando comparada a lâmpadas convencionais.

A TABELA 2 demonstra as propriedades da luz laser comparada à luz convencional.

¹ Ver tópico 2.6.1 à pág. 58.

TABELA 2 – Comparação entre as propriedades da luz laser e fonte de luz convencional.

Propriedade	Laser	Luz convencional
Direcionalidade	Colimado (feixe paralelo)	Não-colimado (luz emitida em todas as direções)
Cor	Monocromática (uma cor); feixe coerente (ordenado no tempo e espaço)	Policromática (muitas cores); feixe não-coerente (desordenado)
Potência de saída	Pode ser alta, média ou baixa	Média ou baixa
Tempo	Pode produzir pulsos muitos curtos ou de alta energia	Pulsos tipicamente longos e de baixa energia
Densidade de energia	Alta; pode ser focalizada em um <i>spot</i> muito pequeno (de diâmetro $d = \lambda$)	Baixa; <i>spot</i> relativamente largo.

O primeiro laser foi construído em 1960 por Theodore Harold Maiman, nos Estados Unidos, e possuía feixe intenso e visível, com pura cor vermelha ($\lambda = 694\text{nm}$) e emissão por poucos milissegundos. Em 1964 Basov e Prokhorov ganharam o prêmio Nobel devido aos progressos na área. Os lasers de baixa potência surgiram com Mester no início da década de 80 (ALMEIDA-LOPES, 2003; CARRINHO, 2004; VALE, 2008).

As primeiras publicações sobre a terapia laser de baixa intensidade (do inglês, “*low level laser therapy*”, LLLT) apareceram há mais de 30 anos. Desde então, diversos estudos foram publicados sobre esse tópico ainda controverso. Nos anos 1960 e 1970, pesquisadores no leste da Europa, especialmente na

União Soviética e Hungria, desenvolveram ativamente a bioestimulação por laser. No entanto, cientistas do mundo inteiro receberam com certo ceticismo os estudos que afirmaram que o laser visível de baixa intensidade poderia agir diretamente sobre um organismo, a nível molecular (KARU, 1989).

Em 1967, Endre Mester (Universidade de Semmelweis, Budapeste – Hungria) noticiou que a aplicação de LLLT sobre o dorso de camundongos que passaram por tricotomia, provocou maior crescimento de pêlos em comparação ao grupo não irradiado (MESTER; SZENDE; TOTA, 1967). Os mesmos autores demonstraram que o laser HeNe pôde estimular a cicatrização de feridas em ratos (MESTER *et al.*, 1971). Pouco tempo depois, passaram a realizar aplicações de LLLT em humanos com quadro de úlceras cutâneas de difícil resolução (MESTER *et al.*, 1972; MESTER *et al.*, 1976).

A partir de então, a LLLT passou a ser utilizada com objetivo de reduzir a inflamação e o edema e atuar sobre doenças articulares crônicas (BJORDAL *et al.*, 2003; CHRISTIE *et al.*, 2007; JAMTVEDT *et al.*, 2008), com a finalidade de promover cicatrização de lesões em tecidos profundos, lesões nervosas (GIGOBENATO; GEUNA; ROCHKIND, 2005; POSTEN *et al.*, 2005) e no tratamento de distúrbios neurológicos e dor (CHOW *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2011).

Esta modalidade de laser é denominada de “baixa intensidade” por possuir densidade de energia bem menor quando comparada a outras aplicações do laser, como em ablação, corte e coagulação de tecidos. Por conta disso, na LLLT as células e tecidos são expostos a baixos níveis de luz vermelha e infravermelha (CHUNG *et al.*, 2011).

Os diferentes aparelhos de laser são determinados principalmente pelo comprimento de onda utilizada, representando a distância entre dois valores consecutivos de onda. Os lasers de baixa potência situam-se entre os comprimentos de onda de 630 a 1300nm, entre a luz visível e a parte mais próxima do infravermelho (BAXTER, 1997; CARRINHO, 2004; VALE, 2008).

O laser GaAs é um laser de baixa potência que possui radiação obtida por meio da estimulação de um diodo semicondutor, composto por cristais de arseneto de gálio. Também conhecido como laser semicondutor ou laser diodo, apresenta comprimento de onda na região do infravermelho, variando de 830 até 904nm (OLIVEIRA, 2008).

Com condutividade inferior a dos metais, os semicondutores ou diodos podem ser de três tipos: silício, germânico e arseneto de gálio. Quando ocorre a passagem da corrente elétrica através dessas substâncias, são produzidas sucessivas combinações eletro-lacunas com emissão de fótons. Todo este processo depende da intensidade da corrente elétrica, que deve ser o suficiente para a estimulação do diodo (BAXTER, 1993; VEÇOSO, 1993).

2.6.1 Influência da coerência da luz

As propriedades de coerência da luz não são manifestadas quando o feixe interage com o tecido em nível molecular (KARU, 1987). Sob condições fisiológicas, a absorção da luz de baixa intensidade por tecidos biológicos é de natureza puramente não-coerente. Estudos demonstram que a nível celular, fontes de luz coerentes ou não-coerentes com mesmo comprimento de onda, intensidade

e tempo de irradiação, promovem os mesmos efeitos biológicos. O uso de LEDs na prática clínica é um exemplo que sustenta essa teoria, bem como o fato de que antes mesmo do surgimento dos lasers, várias bandas de luz visível já possuíam ação estimuladora em organismos e células (KARU *et al.*, 1982; KARU *et al.*, 1983; BERTOLINI *et al.*, 1993).

Lasers são capazes de emitir luz com alto grau de coerência espacial e temporal. A coerência espacial está relacionada à estreita saída do feixe luminoso, que é difração-limitada. O laser pode ser lançado em um feixe de baixíssima divergência, que confere a ele a capacidade de concentrar sua energia por uma longa distância. A coerência temporal (ou longitudinal) implica uma onda polarizada com frequência única, cuja fase está relacionada a uma distância relativamente grande ao longo do feixe (CHUNG *et al.*, 2011).

Matematicamente, a coerência temporal da luz é determinada pela largura espectral, $\Delta\nu$. Durante o tempo de coerência T_{coh} , a luz oscila no ponto em que a irradiação tem uma característica periódica mais forte e regular:

$$\tau_{coh} \cong \frac{1}{\Delta\nu} \quad (5)$$

onde $\Delta\nu$ é a largura espectral do feixe em Hz. Uma vez que a luz se propaga a uma taxa $c = 3 \times 10^{10}$ cm/s, as oscilações da luz são acompanhadas pela fase do comprimento da propagação luminosa L_{coh} .

$$L_{coh} = \frac{c}{\Delta\nu [\text{Hz}]} \quad (6)$$

L_{coh} é a coerência longitudinal. Quanto mais monocromática a luz, mais volume-coerente será o campo luminoso. Para um laser de HeNe com $\Delta\nu = 500$

MHz, $L_{coh} = 60$ cm. No entanto, para um LED que emite $\lambda = 800$ nm ($= 12.500$ cm^{-1}), $\Delta\nu = 160$ cm^{-1} (ou $\Delta\lambda = 10$ nm), $L_{coh} = 1/160$ $\text{cm}^{-1} = 60$ μm . Neste caso, L_{coh} é maior que a espessura de uma única camada de células (≈ 10 a 30 μm). Já a coerência espacial descreve a correlação entre as fases do campo de luz em direção lateral. Por conta disso, a coerência espacial é também chamada de coerência lateral, que possui tamanho (l_{coh}) ligado à divergência (φ) do feixe luminoso no ponto de irradiação:

$$l_{coh} = \frac{\lambda}{\varphi} \quad (7)$$

Fontes de luz convencionais possuem o tamanho da área de emissão significativamente maior do que o comprimento de onda da luz, sendo que várias partes dessa área emite de maneira independente e/ou não-coerente. Neste caso, a magnitude da coerência lateral (l_{coh}) é significativamente menor do que o diâmetro do feixe luminoso, e l_{coh} é determinada pela divergência da luz. Em alguns casos, o efeito terapêutico da luz coerente é maior quando comparado a outros tipos de fontes de radiação. Entretanto, ainda não se pode concluir que os lasers possuam maior potencial terapêutico que os LEDs ou outro tipo de radiação não-coerente (SAZONOV *et al.*, 1985; KARU, 1989; TUNER, 1999).

2.6.2 Fotobiomodulação

A LLLT age induzindo reações fotoquímicas na célula, mesmo com baixos níveis de energia. Este processo é chamado de fotobiomodulação ou bioestimulação.

Em 1988 surgiu a hipótese de que a luz provocaria excitação nas propriedades de oxiredução de transportadores de elétrons (KARU, 1988). A excitação do complexo citocromo-oxidase em cromóforos, como Cu_A, Cu_B ou hemes a(a₃), influencia o estado de oxiredução e a transferência de elétrons nas moléculas (KARU, 1988; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

A citocromo c oxidase é a enzima terminal da cadeia respiratória em células eucarióticas, responsável pela transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, sendo considerada a enzima fotoceptora e transdutora do foto-sinal na região do espectro visível e infravermelho próximo (KARU, 2010). Da mesma forma, a luz deve ser absorvida por cromóforos presentes nas células (LUBART *et al.*, 1992).

A utilização da LLLT ganhou grande visibilidade no tratamento de condições como feridas de difícil resolução, lesões de tecidos moles, artrites e lesões cutâneas. Porém, os mecanismos pelos quais a LLLT atua não estão totalmente compreendidos, sendo que existem várias teorias. Uma delas diz que os efeitos da LLLT – como incremento da síntese de ATP, síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento das células e proliferação celular – estão relacionados aos mecanismos de sinalização intracelular que são ativados pela interação do laser com a molécula fotoceptora mitocondrial, citocromo c oxidase. Atualmente é bem aceito que as mitocôndrias são os sítios iniciais de ação nas células de mamíferos, e isso se deve a uma resposta da citocromo c oxidase (KARU; PYATIBRA; RYABYKH, 2003; MASHA; HOURELD; ABRAHAMSE, 2013).

A influência da LLLT sobre a cadeia transportadora de elétrons vai mais além do que simplesmente aumentar a produção de ATP pela célula. O oxigênio

age como o elétron acceptor final na cadeia transportadora de elétrons e é, por este processo, convertido em água. Parte do oxigênio metabolizado produz espécies reativas de oxigênio (EROs) como subproduto natural (CHUNG *et al.*, 2011).

As EROs são moléculas quimicamente ativas que desempenham um importante papel na sinalização celular, regulação da progressão do ciclo celular, ativação enzimática, de síntese proteica e de ácidos nucleicos (FIGURA 11). Também são responsáveis por ativar fatores de transcrição, levando a um aumento da regulação de vários genes estimuladores e protetores, relacionados à proliferação celular (MOORE *et al.*, 2005), migração (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005) e produção de citocinas e fatores de crescimento (YU *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2003).

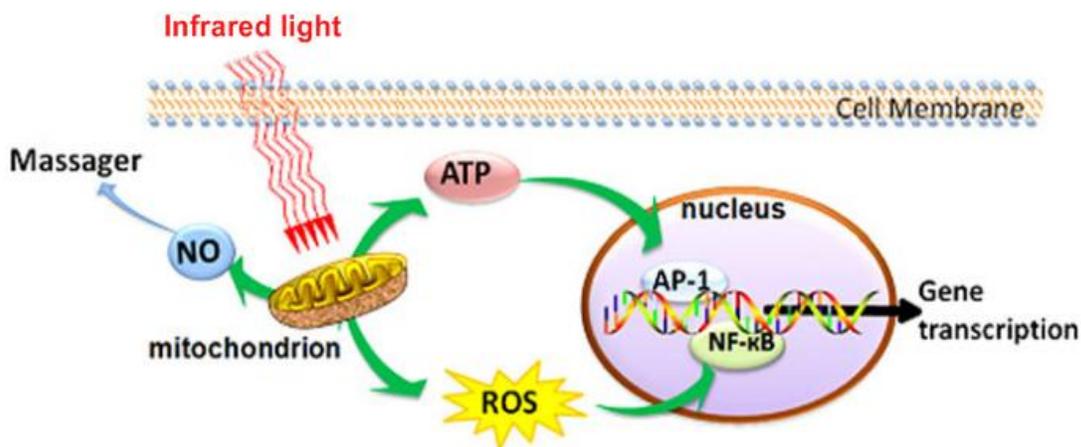


FIGURA 11 – Mecanismos celulares da LLLT. A absorção da luz na região do vermelho ou infravermelho próximo aumenta a produção de ATP durante a respiração mitocondrial, gerando espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) que induzem a ativação de fatores de transcrição. Fonte: Adaptado de Chung *et al.*, 2011.

Os lasers utilizados em fotobiomodulação carregam relativamente pequena quantidade de energia, aproximadamente na faixa de 1 a 3 elétrons/fóton. O processo de absorção luminosa por cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton (EL SAYED & DYSON, 1990).

Cada componente químico absorve a luz de uma forma diferente, devido à sua exclusiva estrutura eletrônica. Os diferentes comprimentos de onda serão absorvidos pelos compostos químicos em diferentes graus (SMITH, 2005; OSHIMA *et al.*, 2011). Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução da atividade celular (EL SAYED & DYSON, 1990).

A nível celular, a fotobiomodulação medeia a proliferação de fibroblastos, incrementa a síntese e proliferação de colágeno e pró-colágeno (BAROLET *et al.*, 2009; OSHIMA *et al.*, 2011) promove a angiogênese, estimula a microcirculação pelo aumento da contribuição nutricional (AGNOL *et al.*, 2009), estimula macrófagos e linfócitos e melhora o metabolismo energético dentro da mitocôndria, além de estimular a produção e crescimento do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator transformante do crescimento (TGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (MESTER & JASZSAGI-NARGY, 1973; LUBART *et al.*, 1992; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997; MESTER; NAGYLUESKAY; MAKO, *et al.*, 1998; DeSMET, *et al.*, 2006).

A irradiação mais eficaz estudada até hoje está na faixa do vermelho e infravermelho próximo, baseado no fato de que a hemoglobina não absorve nesta faixa do espectro, fazendo com que mais luz possa penetrar nos tecidos. As fontes

de luz mais comumente utilizadas, além dos lasers HeNe (632,8nm), gálio-alumínio (GaAl - 630-685nm), arseneto de hélio-neônio (HeNeAs, 780-870nm) e GaAs (904nm), são os diodos emissores de luz com faixa espectral de 670 a 950 nm (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

3 - OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência do Laser GaAs (904nm) no processo de reparo tecidual de músculos gastrocnêmios de camundongos submetidos à mionecrose por injeção do veneno de *Bothrops jararacussu*.

3.2 Específicos

- 1 Mensurar possíveis alterações no padrão de marcha dos animais;
- 2 Analisar em que período pós-lesão há maior expressão relativa de genes relacionados ao mecanismo de regeneração muscular;
- 3 Verificar a eficácia do laser GaAs no processo de reparo muscular sob os pontos de vista histológico e morfométrico;
- 4 Caracterizar as alterações moleculares e teciduais por meio de diferentes tipos de análise espectroscópica.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente estudo foi aprovado² pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Instituto de Biologia/IB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, sob o número de protocolo 2950-1. Foi utilizado total de 184 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos adulto-jovens (6-8 semanas de idade) com massa corporal média de $22-25 \pm 3g$, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP, Campinas - SP e da ANILAB (Animais de Laboratório), Paulínia - SP.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas padrão em número de cinco animais cada, onde permaneceram em temperatura ambiente controlada (18 a 20°C), com livre acesso à alimentação (ração Purina) e água *ad libitum*, e ciclo de iluminação controlado de “12 horas claro” e “12 horas escuro”. Inicialmente os animais foram pesados, identificados e divididos entre os diferentes grupos experimentais de maneira randomizada.

Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguido por deslocamento cervical. Todos os procedimentos foram realizados obedecendo ao padrão internacional de manipulação animal.

² Certificado de Aprovação consta em ANEXO I à pág. 209

4.2 Descrição dos grupos experimentais

Os animais foram divididos em 13 (treze) grupos experimentais que se encontram descritos na TABELA 3 a seguir:

TABELA 3 – Caracterização dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Amostra
Grupo controle (intacto) (GC)	14
Grupo salina 48h (S48)	13
Grupo salina + laser 48h (SL48)	13
Grupo salina + laser placebo 48h (SLP48)	08
Grupo veneno 48h (V48)	19
Grupo veneno + laser 48h (VL48)	19
Grupo veneno + laser placebo 48h (VLP48)	13
Grupo salina 72h (S72)	13
Grupo salina + laser 72h (SL72)	13
Grupo salina + laser placebo 72h (SLP72)	08
Grupo veneno 72h (V72)	19
Grupo veneno + laser 72h (VL72)	19
Grupo veneno + laser placebo 72h (VLP72)	13
Total:	184

4.2.1 Grupo controle (*intacto*) (GC)

Os animais deste grupo não sofreram qualquer tipo de lesão e/ou tratamento. Foram sacrificados para coleta do gastrocnêmio direito.

4.2.2 Grupo salina 48h (S48)

Neste grupo, os animais receberam injeção intramuscular (i.m.) de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio; permaneceram sem tratamento e após 48h da injeção, os animais foram sacrificados e os músculos foram extraídos.

4.2.3 Grupo salina + laser 48h (SL48)

Os animais receberam injeção i.m. de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, receberam irradiação com laser (GaAs). Este procedimento foi repetido ao se completarem 24 e 48h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.4 Grupo salina + laser placebo 48h (SLP48)

Os animais receberam injeção i.m. de solução salina no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram submetidos ao tratamento, porém com aparelho laser desligado. Este procedimento foi repetido ao se completarem 24 e 48h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise. Os grupos Placebo foram acrescentados ao trabalho para que todas as variáveis relacionadas à manipulação animal fossem minimizadas e não houvesse mascaramentos da real influência do laser.

4.2.5 Grupo veneno 48h (V48)

Neste grupo, os animais receberam injeção i.m. do veneno de *Bjssu* na porção média do gastrocnêmio (injeção de \approx 8mm de profundidade); permaneceram sem tratamento e após 48h da injeção, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.6 Grupo veneno + laser 48h (VL48)

Os animais receberam injeção i.m. de *Bjssu* na porção média do gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram irradiados com laser (GaAs). Este procedimento foi repetido ao se completarem 24 e 48h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.7 Grupo veneno + laser placebo 48h (VLP48)

Os animais receberam injeção i.m. de *Bjssu* na porção média do gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram submetidos ao tratamento, porém com aparelho laser desligado. Este procedimento foi repetido ao se completarem 24 e 48h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.8 Grupo salina 72h (S72)

Neste grupo, os animais receberam injeção i.m. de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio. Permaneceram sem tratamento e após 72h da injeção, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.9 Grupo salina + laser 72h (SL72)

Os animais receberam injeção i.m. de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram irradiados com laser (GaAs). Este procedimento foi repetido ao se completarem 24, 48 e 72h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.10 Grupo salina + laser placebo 72h (SLP72)

Os animais receberam injeção i.m. de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram submetidos ao tratamento, porém com aparelho laser desligado. Este procedimento foi repetido ao se completarem 24, 48 e 72h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.11 Grupo veneno 72h (V72)

Neste grupo, os animais receberam injeção i.m. de *Bjssu* no gastrocnêmio. Permaneceram sem tratamento e após 72h da injeção, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

4.2.12 Grupo veneno + laser 72h (VL72)

Os animais receberam injeção i.m. de *Bjssu* no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram irradiados com laser (GaAs). Este procedimento foi repetido ao se completarem 24, 48 e 72h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e extraídos para análise.

4.2.13 Grupo veneno + laser placebo 72h (VLP72)

Os animais receberam injeção i.m. de *Bjssu* no gastrocnêmio. Após 3h da injeção, foram submetidos ao tratamento, porém com aparelho laser desligado. Este procedimento foi repetido ao se completarem 24, 48 e 72h pós-injeção. Terminado o período, os animais foram sacrificados e os músculos extraídos para análise.

Resumidamente, o protocolo de tratamento constituído pelos principais momentos de análise (*), grupos experimentais e técnicas empregadas em cada grupo/período está ilustrado na FIGURA 12:

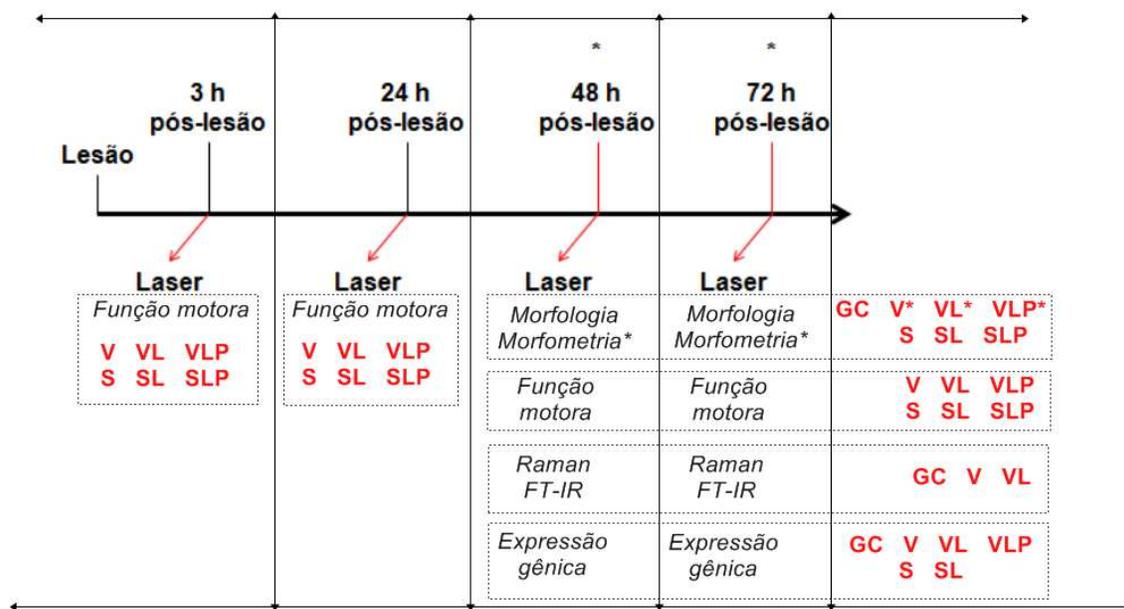


FIGURA 12 – Esquema caracterizando toda abordagem experimental para os diferentes grupos e períodos de análise.

4.3 Indução da mionecrose

O veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjssu*) liofilizado foi mantido a 10°C e preparado em solução estéril de NaCl 0,9% no momento do uso. Dose única do veneno na concentração de 0,83mg/kg foi injetada via i.m. na porção média do gastrocnêmio direito (injeção de ≈ 8mm de profundidade). Os animais dos grupos “salina” receberam injeção i.m. de 20-25µl (dose única) de solução salina (NaCl 0,9%) no m. gastrocnêmio direito.

4.4 Irradiação com laser

Foi utilizado aparelho de emissão Laser *Physiolux Dual* (BIOSET® - Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. Rio Claro, SP – Brasil) probe 904nm

(GaAs) infravermelho, com escalas graduadas em joules/cm² e minutos/segundos, cedido pelo Laboratório de Nanotecnologia e Diamante - Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) - UNICAMP. Os parâmetros da irradiação estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 – Parâmetros de irradiação Laser.

Propriedades	Valores
Composição	Gálio-Arseneto (GaAs)
Comprimento de onda (λ)	904 nm
Densidade de energia (DE)	4J/cm ²
Potência	25W (pico)
Tempo	1'32"
Área irradiada	1,2cm ²

As aplicações seguiram os períodos descritos nos respectivos grupos e foram realizadas com as lâmpadas da sala acesas. O tratamento foi realizado sempre no mesmo período do dia. A luz foi incidida sobre o membro do animal em um ângulo de 90°, diretamente sobre a pele. Para atenuar a reflexão da luz, foi previamente realizada tricotomia da região com auxílio do aparelho *Nasal Trimmer* - WAHL®.

4.5 Análise da função motora dinâmica

Para esta análise foi utilizado o equipamento *CatWalk XT* (Noldus *Information Technology*® - Holanda) (FIGURA 13), composto por um sistema automatizado para análise da marcha, o qual permite a mensuração de

parâmetros estáticos e dinâmicos (WANG *et al.*, 2008). A tecnologia entrou recentemente para a lista de testes funcionais capazes de detectar multiplicidade de parâmetros do aparelho locomotor (BOZKURT *et al.*, 2011).

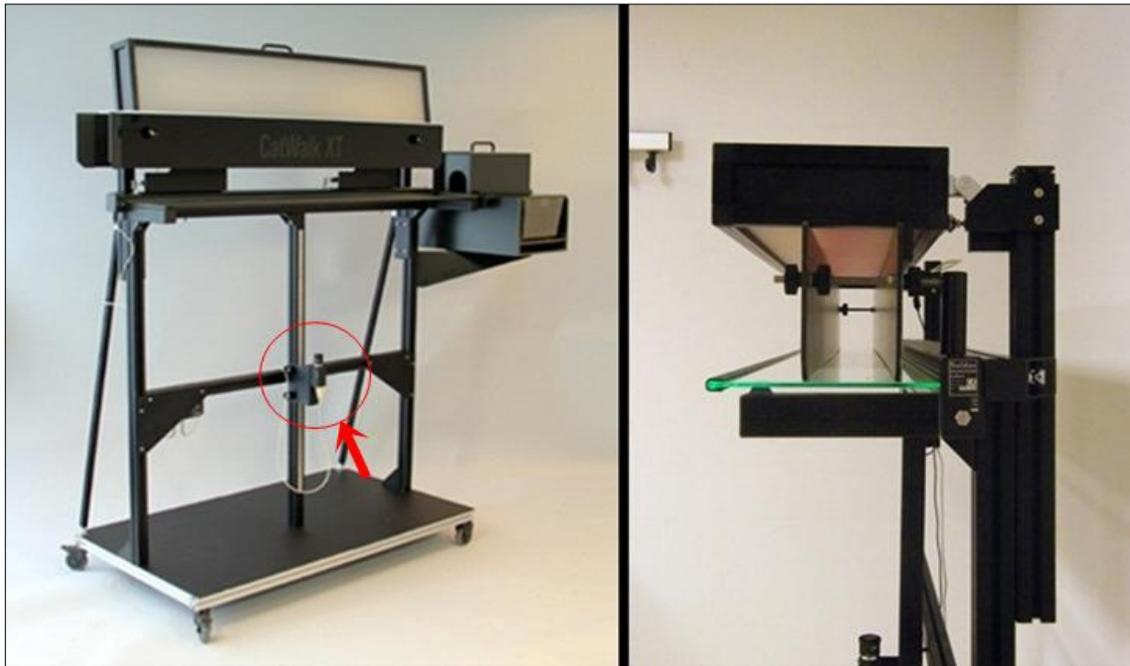


FIGURA 13 – Sistema *CatWalk* para análise da função motora dinâmica. Vista anterolateral e lateral. Destaque para a câmera digital acoplada sob a passarela. Fonte: Adaptado de www.noldus.com.

Cinco animais de cada grupo experimental foram submetidos exclusivamente à análise da função motora dinâmica. Os dados foram capturados nos momentos descritos na FIGURA 14:

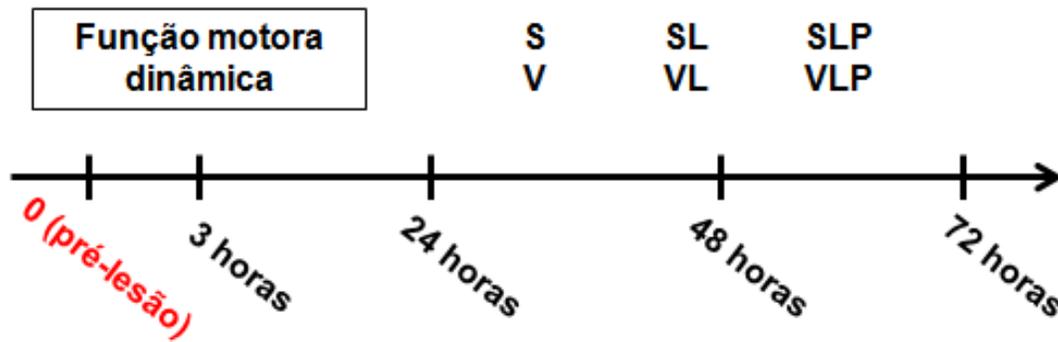


FIGURA 14 – Períodos de análise da função motora dinâmica. Os cinco animais de cada um dos grupos: V (veneno), VL (veneno + laser), VLP (veneno + laser placebo), S (salina), SL (salina + laser) e SLP (salina + laser placebo) passaram por análise desde o período 0 (pré-lesão) até 72 horas pós-lesão/injeção.

A câmera digital acoplada sob a passarela foi ajustada com ganho de 30,99 e limiar de intensidade 0,15. Para validação dos dados de cada corrida, os animais tiveram que realizar o percurso em um trecho calibrado de 20 X 10 cm, atravessando a passarela de um lado a outro e obedecendo a alguns parâmetros: tempo mínimo de 0,5 s; tempo máximo de 5 s; variação máxima de velocidade de 40%.

Foi realizada para cada animal a quantidade de corridas necessárias até completarem-se três que obedecessem aos parâmetros delimitados no experimento. Cada grupo experimental totalizou 15 corridas para cada um dos períodos (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). As corridas do período pré-lesão serviram para constituir a *baseline* (referência/padrão) de cada animal.

O software *CatWalk XT 9.1*[®] arquivou as corridas que obedeceram às especificações descritas anteriormente. A partir das capturas foram gerados

gráficos de pressão plantar (FIGURA 15) e diversos parâmetros estáticos e dinâmicos relativos às quatro patas.

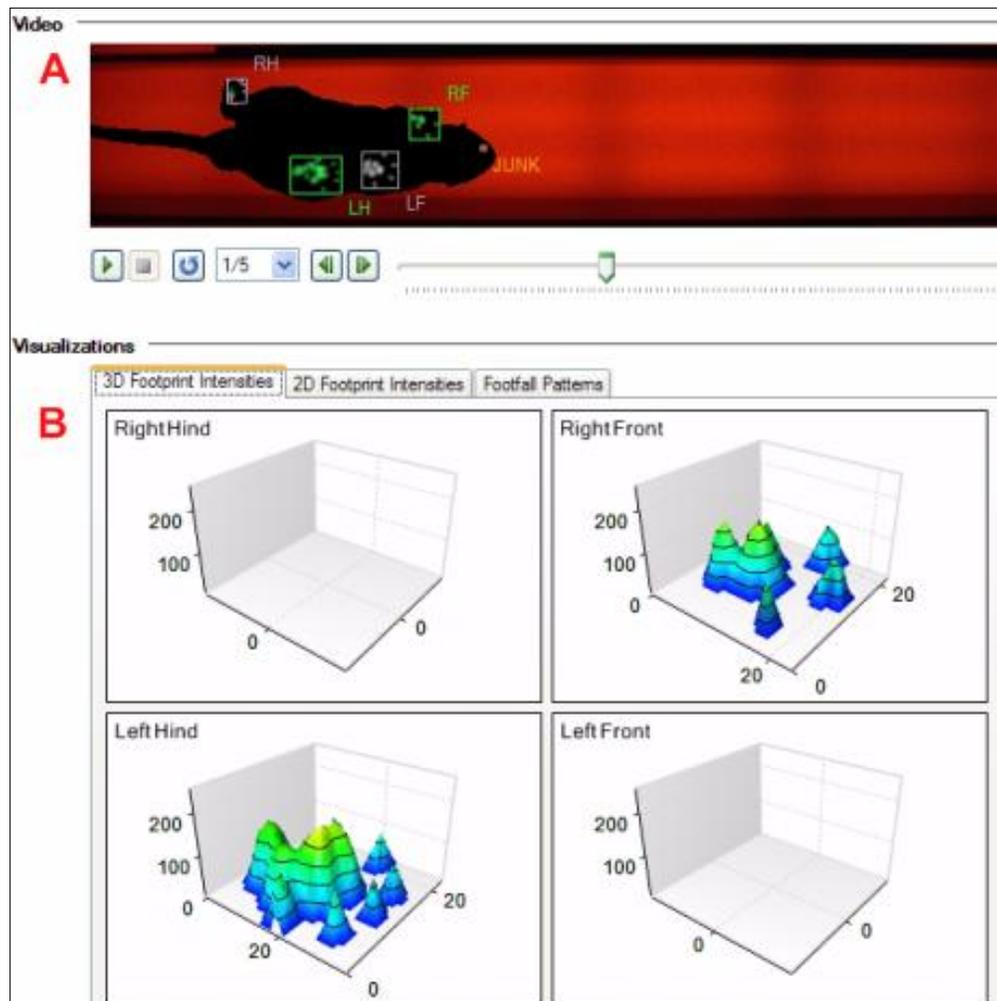


FIGURA 15 – (A) Imagem obtida inferiormente à passarela e (B) gráficos de pressão plantar. O contraste causado pela pisada do animal é classificado em RF (*right front* - pata frontal direita), LF (*left front* - pata frontal esquerda), RH (*right hind* - pata posterior direita) ou LH (*left hind* - pata posterior esquerda). Simultaneamente, são gerados gráficos 2D e 3D referentes à intensidade aplicada pelo animal em cada uma das patas.

Os parâmetros selecionados para o estudo encontram-se descritos a seguir:

- *Apoio*: duração em segundos do contato da pata do animal com a passarela;

- *Intensidade máxima*: máximo de intensidade (em unidades arbitrárias) aplicada pelo animal referente a uma pata, considerando o trajeto completo;

- *Balanço*: também chamada de fase de balanço, é a duração (em segundos) que a pata permanece sem contato com a passarela;

- *Velocidade do balanço*: velocidade (unidade de distância/ segundo) da pata durante o balanço. A fórmula é a seguinte:

$$\text{Velocidade do balanço} = \frac{\text{comprimento da passada}}{\text{balanço}} \quad (9)$$

- *Comprimento da passada*: distância (em unidades de distância) entre dois posicionamentos de uma mesma pata. O cálculo deste parâmetro da marcha é baseado nas coordenadas X do centro da pegada de dois posicionamentos sucessivos de uma mesma pata durante o contato máximo, levando em conta o Teorema de Pitágoras (FIGURA 16).



FIGURA 16 – Comprimento da passada: distância entre dois posicionamentos sucessivos de uma mesma pata.

- *Ciclo do passo*: é o tempo em segundos entre dois contatos iniciais consecutivos da mesma pata, sendo:

$$\text{Ciclo do passo} = \text{Apoio} + \text{Balanço} \quad (10)$$

A FIGURA 17 a seguir ilustra o Ciclo do passo (*Step cycle*), a fase de Apoio (*Stand*) e a fase de balanço da marcha (*Swing*):

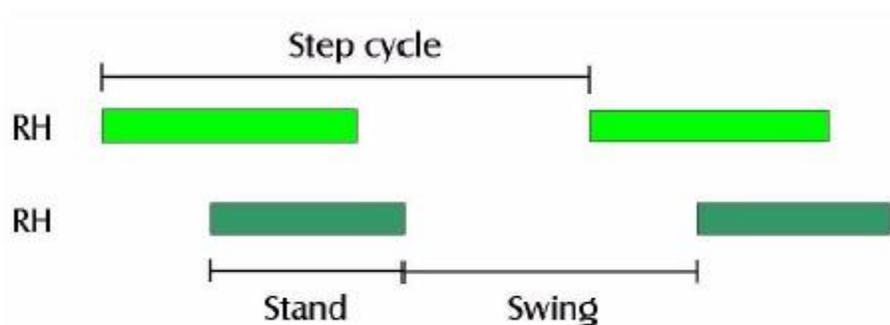


FIGURA 17 – Ciclo do passo: fase de apoio + fase de balanço.

- *Apoio único*: refere-se à duração em segundos do contato de uma única pata posterior com a passarela. Este dado é utilizado para análise de marcha em modelos de dor e pode ser considerado como a parte do *ciclo do passo* de uma pata posterior em que a pata contralateral não toca a passarela.

Os dados foram transferidos para uma planilha do *Microsoft Excel for Windows*[®] no microcomputador conectado ao equipamento. Foi considerada a média entre as três corridas obtidas de cada animal. Os dados capturados referem-se aos membros posterior esquerdo [controle (LH - *left hind*)] e posterior direito [lesionado (RH - *right hind*)].

4.6 Coleta de material

Para a coleta de material, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ seguido por deslocamento cervical. Com auxílio de pinça dente-de-rato e tesoura autoclavadas (FIGURA 18) o m. gastrocnêmio foi retirado a partir das regiões miotendíneas (proximal e distal). Todos os procedimentos foram realizados obedecendo ao padrão internacional de manipulação animal.



FIGURA 18 – Técnica de extração do m. gastrocnêmio, com auxílio de pinça dente-de-rato e tesoura autoclavadas.

4.6.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total e posterior análise da expressão gênica, foi coletado o músculo gastrocnêmio direito de cinco espécimes ($n = 5$) de cada grupo. As amostras foram fragmentadas com auxílio de uma tesoura (autoclavada e tratada com água DEPC) e transferidas para um tubo “falcon” contendo TRIzol[®] (Invitrogen Life Technologies[™], EUA) (na proporção de 1ml para cada 1mg de

tecido muscular). O material foi homogeneizado com auxílio de uma seringa de 1ml e agulha 1,2 X 40mm e transferidos para tubos “ependorf” estéreis (1,5ml).

Os tubos com material de coleta foram deixados por 3min à temperatura ambiente. A cada 1ml de suspensão foi adicionado 0,2ml de clorofórmio (*Sigma*[®]), sendo as amostras gentilmente agitadas por 15s. Em seguida os materiais foram centrifugados a 13000rpm por 15min a 4°C, em centrífuga refrigerada *Eppendorf 5430 R*[®]. A fase aquosa foi transferida para um tubo “ependorf” novo, ao qual foi adicionado 0,5ml de álcool isopropílico (isopropanol), agitado gentilmente por 10s e deixado 10min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 13000rpm por 10min a 4°C para precipitar o RNA da fase aquosa.

Ao precipitado (“pellet”) foi adicionado 1ml de etanol 70% e novamente centrifugado a 7000rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o material foi deixado em temperatura ambiente, com o tubo invertido sobre um papel filtro. As amostras de RNA foram suspensas em 50µl de água DEPC e posteriormente armazenadas a -80°C.

Para a determinação da concentração e da pureza do RNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*[®]), a partir da absorbância 260nm e razões 280/260nm e 260/230nm. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 0,5X.

A partir do RNA total foi realizada a síntese de cDNA utilizando o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*[®]). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total, acrescido de 1µl de Primer Oligo-(dT)₁₈ (100µM) e quantidade suficiente de H₂O tratada com DEPC para um volume final

de 12µl. Tal mistura foi submetida à desnaturação por 5min a 65°C. Após este período de incubação, foram acrescentados à mistura 4µl de Tampão de Reação (5X), 1µl de dNTP (10mM), 1µl de Inibidor de RNase *Ribolok* (20u/µl) e 1µl de *RivertAid H Minus Transcriptase Reversa* (200 u/µl). As amostras foram incubadas novamente por 1h a 42°C e 5min a 70°C. O cDNA originado foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop2000 – *Thermo Scientific*[™]), como descrito anteriormente, e sua integridade foi analisada em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X.

4.6.2 Real-Time RT- qPCR

4.6.2.1 *Desenho de primers específicos para ensaios de qPCR*

Primers específicos foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer Blast - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com base no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e confeccionados comercialmente. Os *primers* foram desenhados de forma a produzirem *amplicons* menores que 200pb, pois acima deste tamanho a eficiência da reação pode ser prejudicada (COSSEAU *et al.*, 2009). Os *primers* sintetizados foram selecionados e analisados pela ausência de formação de dímeros, *cross-dímeros* e *harpins*, com temperatura de anelamento³ em torno de 60°C e conteúdo de GC (guanina-citosina) entre 50-55%. Foram desenhados *primers* específicos para os genes *MyoD*, *Miogenina*, *Pax7* (*paired box 7*), *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate*

³ Foi preconizado o anelamento do *primer* ao gene alvo no intervalo entre diferentes exons. A região escolhida de cada gene pode ser consultada nos gráficos do ANEXO II à pág. 210.

dehydrogenase) e *Rps29* (*Ribosomal protein S29*), cujas sequências estão descritas abaixo, na TABELA 5:

TABELA 5 - Sequências-alvo.

Gene	Forward	Reverse	GenBank
<i>GAPDH</i>	AAGGGCTCAT	CAGGGATGAT	<i>NM_008084.2</i>
	GACCACAGTC	GTTCTGGGCA	
<i>Rps29</i>	GGGCGTCTGAA	TTGGAGCAGA	<i>NM_009093.2</i>
	GGCAAGATGGG	CGCGGCAAGAG	
<i>MyoD</i>	TACAGTGGCG	GTAGTAGGCG	<i>NM_010866.2</i>
	ACTCAGATGC	GTGTCGTAGC	
<i>Miogenina</i>	GTCCCAACCCA	TTTCGTCTGG	<i>NM_031189.2</i>
	GGAGATCATT	GAAGGCAACA	
<i>Pax7</i>	CTGGAAGTGT	TTGTGACGGA	<i>NM_011039.2</i>
	CCACCCCTCT	TGTGGTTCGG	

4.6.2.2 Teste dos primers por RT-PCR

Os *primers* confeccionados para os ensaios de qPCR foram primeiramente testados quanto à especificidade de amplificação por meio de reações de PCR tradicionais, utilizando cDNA confeccionado a partir de amostras de RNA de gastrocnêmios de camundongos do grupo controle (GC).

A reação de PCR foi realizada com o kit *Taq DNA Polymerase Recombinant* (*Thermo Scientific*[®]) contendo 2µl de Tampão de Reação (10X), 0,5µl de dNTP (10mM), 1µl de MgCl₂ (mM), 0,5µl de Primer Senso e Antisenso (10µM), 1µl de cDNA (diluído 10X a partir do RNA total), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5u/µL) e 13,3µl de H₂O tratada com DEPC.

As reações foram incubadas em termociclador *Eppendorf*[®] para uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 45s, 72°C por 1min e uma etapa final de extensão a 72°C por 10min. O resultado obtido na reação de PCR foi checado após aplicação das amostras em gel de agarose 2% em tampão de corrida TAE 0,5X.

4.6.2.3 *Análise de expressão gênica relativa por qPCR*

A técnica de *qPCR* ou PCR em Tempo Real – que consiste na quantificação absoluta ou relativa de produtos de PCR específicos – foi empregada para que pudéssemos comparar o perfil de expressão dos genes de interesse nos diferentes grupos de tratamento analisados.

Essa técnica consiste basicamente no monitoramento do aumento da fluorescência ao longo da progressão dos ciclos de PCR, permitindo a quantificação de *mRNA* específico presente na amostra no momento em que a fluorescência captada pelo equipamento atinge o limiar de detecção, chamado de *threshold cycle (Ct)*.

O número de *Ct* fornecido pelo equipamento é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de *Ct* maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN & LIVAK *et al.*, 2008). Ensaios de expressão gênica relativa necessitam ser relacionados a um gene constitutivamente expresso (*housekeeping* - gene de referência) onde diferentes condições experimentais não alterem sua expressão (SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK *et al.*, 2000).

Para que pudéssemos dar início aos ensaios e eliminar possíveis erros relatados pelo uso de apenas um *housekeeping*, foram testados dois genes de referência comumente utilizados: *GAPDH* e *Rps29*. Estes genes foram testados nos diferentes tratamentos e analisados pelo programa *BestKeeper* (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html>), que consiste em uma planilha do *Microsoft Excel*[®] que calcula o gene mais estável nos diferentes tratamentos (PTAFFL *et al.*, 2004).

A eficiência de amplificação (E) de cada um dos pares de *primers* foi determinada por meio de uma curva padrão composta de cinco pontos, gerada a partir de reações em duplicata de *qPCR* nas quais foram utilizados diluições seriadas (1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625) de cDNA. A eficiência da PCR (E) para cada gene estudado foi estimada pela equação $E = 10^{(-1/slope)}$ (RAMAKERS *et al.*, 2003), onde o *slope* corresponde ao valor da inclinação da curva em regressão linear. Eficiências com valores entre 90% e 110% foram consideradas como ideais e utilizadas como 100% para os cálculos de expressão relativa.

As reações de *qPCR* foram realizadas com 200ng de cDNA, sintetizado conforme descrito anteriormente, em duplicatas no equipamento *StepOnePlus*[™] *Real Time PCR System* (Applied Biosystems[®]) com o kit KAPA[™] SYBR[®] FAST Universal qPCR 2X (Master Mix), contendo Platinum[®] *Taq* DNA polymerase, SYBR[®] Green I dye, Tris-HCl, KCl, 6mM MgCl₂, 400μM dCTP, 800μM dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e estabilizadores.

Para um volume final de 10μl de reação foram adicionados 5μl de SYBR[®] Green Master Mix, 0,25μl de *primer forward* (10μM), 0,25μl de *primer reverse* (10μM) e 3,5μl de H₂O tratada com DEPC. As reações foram preparadas em

duplicata, adicionadas em placas ópticas *MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode* (0,1ml) (*Applied Biosystems[®]*).

Uma vez preparadas as reações, as mesmas foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 15s e 72°C por 20s, seguido por uma etapa final para a construção da curva de *melting* de 72°C por 20s, 60°C por 1min e 95°C por 15s. A construção da curva de *melting* é essencial para demonstrar a especificidade do *primer*.

A quantidade relativa (QR) foi calculada utilizando-se o método de *Ct* comparativo $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), seguindo a seguinte fórmula:

$$QR = E^{2-\Delta\Delta Ct} \quad (11)$$

sendo que 2 corresponde à eficiência da reação, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamento}} - \Delta Ct_{\text{referência}}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) e $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{controle endógeno}}$.

4.6.3 Estudo morfológico e morfométrico

Para o estudo morfológico e morfométrico foram utilizadas três ($n = 3$) espécimes de cada grupo.

Os músculos coletados foram processados, incluídos em parafina, emblocados e a partir dos blocos foram realizados cortes seriados com 5 μ m de espessura em micrótomo *Leica[®]*. Os cortes foram transferidos para lâminas de microscopia e corados com hematoxilina – eosina (H&E). A análise qualitativa das

lâminas foi realizada em Microscópio Óptico (MO) *Leica*[®] por dois observadores distintos. Foram avaliados aspectos morfológicos genéricos do tecido muscular pelas reações de H&E. Imagens gerais do corte, com ampliação de 400X, foram obtidas de cada grupo experimental com auxílio do software *Image Pro-Plus*[®] em microscópio óptico *Leica DM 2500* pela câmera de vídeo digital *Leica DFC 300FX*, conectada a um microcomputador.

A análise morfométrica da área mionecrótica foi realizada a partir da captura de imagens dos cortes histológicos de maneira similar à descrita no parágrafo anterior, no entanto, foram considerados apenas os grupos **V48**, **V72**, **VL48**, **VL72**, **VLP48** e **VLP72**. Foram obtidas de 3 a 4 imagens com ampliação de 10X a partir de uma lâmina selecionada de cada animal. Após a obtenção das imagens foi montada uma imagem panorâmica (*photomerge*) (resolução de 300dpi) com auxílio do software *Adobe Photoshop CS6*[®]. Em seguida, foi realizada a medida da relação entre a área mionecrótica e a área total do corte histológico (mm²), consistindo no percentual de área lesionada, utilizando o software *Image-J*[®] (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland). Para esta última análise considerou-se o cálculo abaixo:

$$\frac{\text{área da lesão (mm}^2\text{)}}{\text{área total do corte histológico (mm}^2\text{)}} \times 100 \quad (12)$$

4.6.4 Espectroscopia Raman

Este tipo de espectroscopia é baseado no efeito Raman, o qual pode ser caracterizado basicamente como o efeito do espalhamento da luz (GAUGLITZ & VO-DINH, 2003).

Quando a energia do fóton incidente permanece inalterada após colisão com uma molécula, o fóton espalhado tem a mesma frequência que o fóton incidente. Esta situação é caracterizada como espalhamento *Rayleigh* ou espalhamento elástico. Quando a energia é transferida da molécula para o fóton ou vice-versa, o fóton espalhado tem mais (*anti-stokes*) ou menos (*stokes*) energia que o fóton incidente, caracterizando o espalhamento inelástico ou espalhamento Raman (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007) (FIGURA 19).

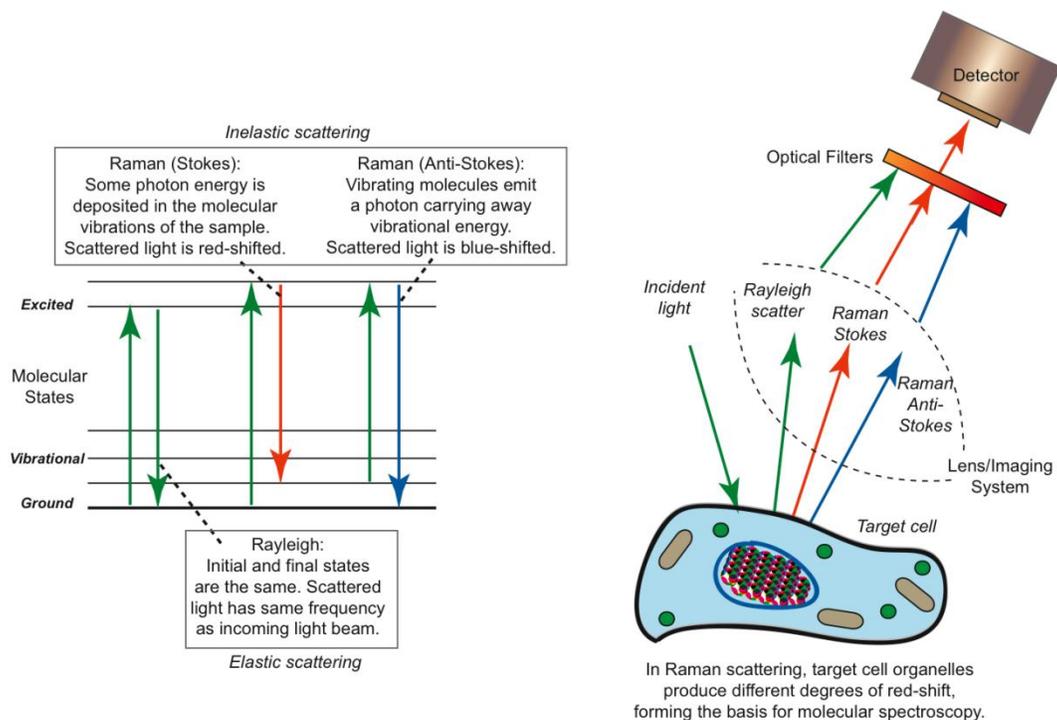


FIGURA 19 – Diferenças entre espalhamento elástico (*Rayleigh*) e inelástico (*Stokes e Anti-stokes Raman*). Fonte: <http://nicsiejazzfit29.soup.io/post/363086982/raman-microscopy>.

Os tecidos afetados por condições patológicas sofrem mudanças na sua composição. Estas alterações podem ser refletidas em espectros de espalhamento Raman, caracterizando uma espécie de identidade molecular do tecido em análise (CHOO-SMITH *et al.*, 2002).

Neste estudo foram considerados os seguintes grupos para análise: **GC**, **V48**, **V72**, **VL48** e **VL72**, sendo $n=3$ por grupo. Ao serem extraídos, os músculos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido ($-196,15^{\circ}\text{C}$). A leitura foi realizada em um aparelho *Renishaw inVia Raman Microscope*[®] por meio do laser infravermelho próximo ($\lambda = 785\text{nm}$), localizado no DSIF/FEEC - UNICAMP.

O diagrama em blocos do sistema Raman é demonstrado na FIGURA 20 a seguir:

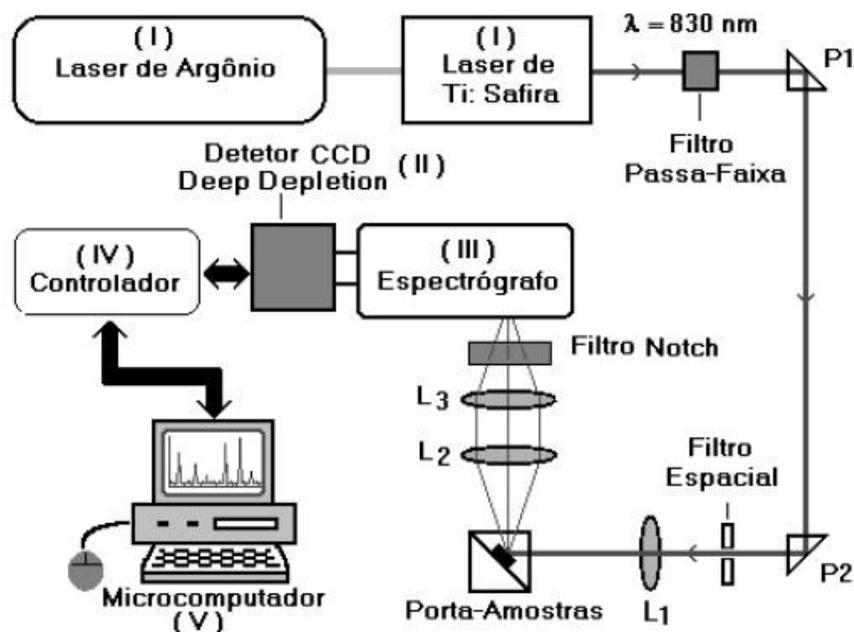


FIGURA 20 – Diagrama em blocos ilustrando o funcionamento de um sistema Raman de bancada. Fonte: Adaptado de Souza e colaboradores (2003).

Os picos foram plotados em gráficos que consistem de eixo X – deslocamento Raman (cm^{-1}) – e intensidade arbitrária, eixo y (*intensity* – a.u.). Picos referentes a raios cósmicos foram removidos dos espectros. Para análise qualitativa dos resultados, a identidade molecular que os picos representam foi baseada na revisão de Movasaghi, Rehman e Rehman (2007).

4.6.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A interação de moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética pode ser evidenciada pela técnica de espectroscopia no infravermelho, a qual pode ser utilizada para detectar alterações moleculares relacionadas aos tecidos em diversos estados patológicos.

A FT-IR consiste na geração de um interferograma, utilizando-se de um interferômetro do tipo Michelson (FIGURA 21), também conhecido como configuração derivada, que tem a função de dividir o feixe da radiação incidente em duas partes: feixe de referência e feixe incidente na amostra. No momento da recombinação dos feixes, são geradas interferências construtivas e destrutivas descritas pela *função cosseno*. A partir da somatória de várias funções cosseno típicas de todos os comprimentos de onda incidentes, é formado o interferograma. A transformada de Fourier converte o interferograma recebido pelo detector, passando do domínio do tempo para o domínio da frequência (GAUGLITZ & VODINH, 2003).

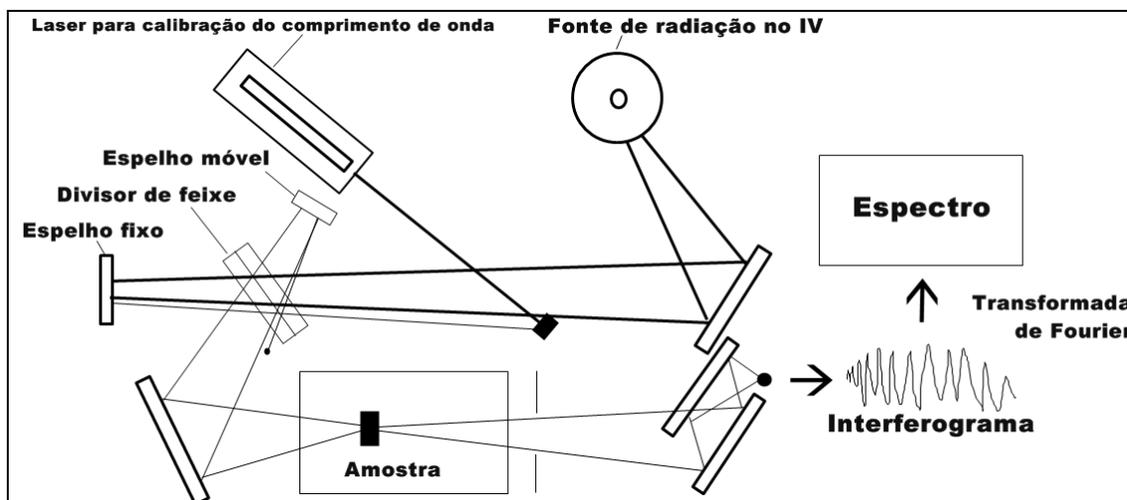


FIGURA 21 – Diagrama em blocos de um interferômetro do tipo Michelson.

Para esta metodologia, foram selecionados cinco grupos, sendo: **GC**, **V48**, **V72**, **VL48** e **VL72** ($n=3$ por grupo). Os músculos foram liofilizados⁴ (componente aquoso) em liofilizador da marca *Christ*[®] – modelo *Alpha 2-4 plus*, utilizando-se dos seguintes parâmetros: *main drying* (durante 23h) com pressão atmosférica de 0,22 mbar a -35°C ; *final drying* (durante 1h) com pressão atmosférica de 2,5 mbar a -10°C .

Foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio (KBr), em concentração de 150mg para cada 1mg de músculo liofilizado, considerando para este último a região central do ventre muscular. O KBr e as amostras foram macerados, um a um, em almofariz por ± 10 min. O pastilhador foi ajustado para uma pressão de 10t sob vácuo de ≈ 700 mmHg durante 5min.

⁴ A liofilização dos músculos foi realizada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP.

Para gerar os espectros das amostras, foi utilizado o espectrofotômetro infravermelho médio *Spectrum GX* (*PerkinElmer*[®]) na faixa de 4000 a 400cm⁻¹ com resolução de 4cm⁻¹. Cada espectro obtido refere-se a 12 varreduras⁵.

Os espectros foram pré-processados com auxílio do software *Spectrum 5.3* (*PerkinElmer*[®]) e feitas as correções de linhas de base, suavização espectral e colocados em absorbância.

4.7 Análise estatística

As análises entre três ou mais grupos experimentais foram submetidas ao teste de variância ANOVA *one-way*, seguido pelo *Tukey's Multiple Comparison Test*. As análises entre apenas dois grupos ou amostras foram realizadas por meio do teste-*t*.

Para todas as análises foram considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos. Os testes foram aplicados por meio dos programas *GraphPad Prism 5.0*[®] (GraphPad Software Inc., EUA) e *The SAS System for Windows* (Statistical Analysis System), versão 9.3 (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA).

⁵ A confecção das pastilhas de KBr e a leitura dos espectros por FT-IR foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.

5 - RESULTADOS

5.1 Análise da função motora dinâmica

As médias dos dados referentes às três corridas de cada animal, representadas pelas patas traseiras nos diferentes grupos e períodos, encontram-se nas tabelas do APÊNDICE A.

A partir da análise visual direta dos vídeos de cada corrida, observou-se que nos grupos **V** e **VLP**, 3h após a injeção de *Bjssu*, os animais não realizaram apoio com o membro posterior direito (MPD - *RH*) durante o trajeto percorrido. A FIGURA 22 (A) mostra que a pata traseira direita não tocou a passarela. O gráfico 2D (*2D footprint intensities*), gerado automaticamente pelo software *CatWalk XT 9.1*[®], demonstrou intensidade nula do MPD no período de 3h nos grupos **V** e **VLP** (FIGURA 22 – B).

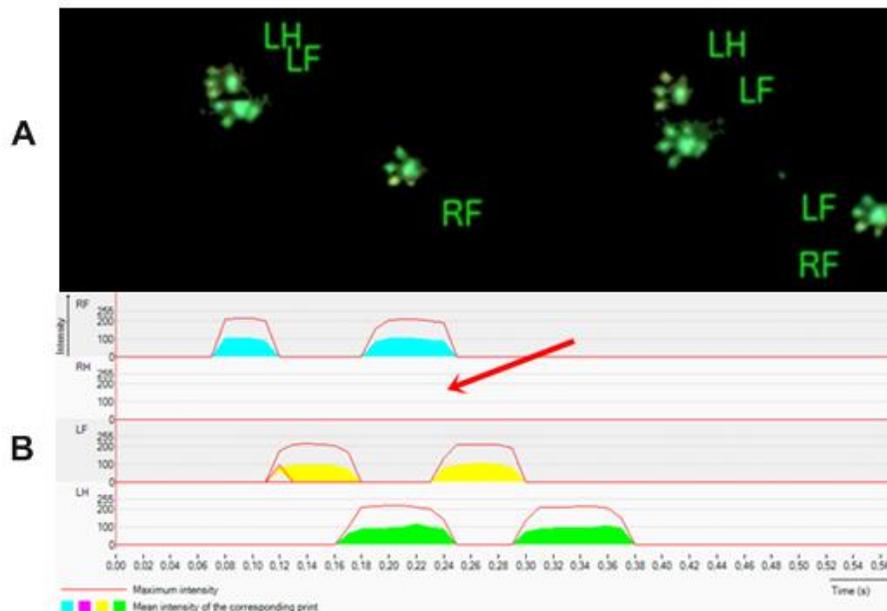


FIGURA 22 – **A:** Impressão nula da pata posterior direita (RH). O animal não tocou a passarela com o MPD. **B:** *2D footprint intensities* demonstrando intensidade máxima nula para o MPD, representado pela pata posterior direita (RH).

Nos demais grupos – incluindo os submetidos à LLLT – para o mesmo período (3h), não foram observadas alterações quanto ao apoio realizado pelo MPD. Na análise visual direta, o padrão de marcha dos animais manteve-se normal em comparação ao período pré-lesão, conforme pode ser observado na FIGURA 23:

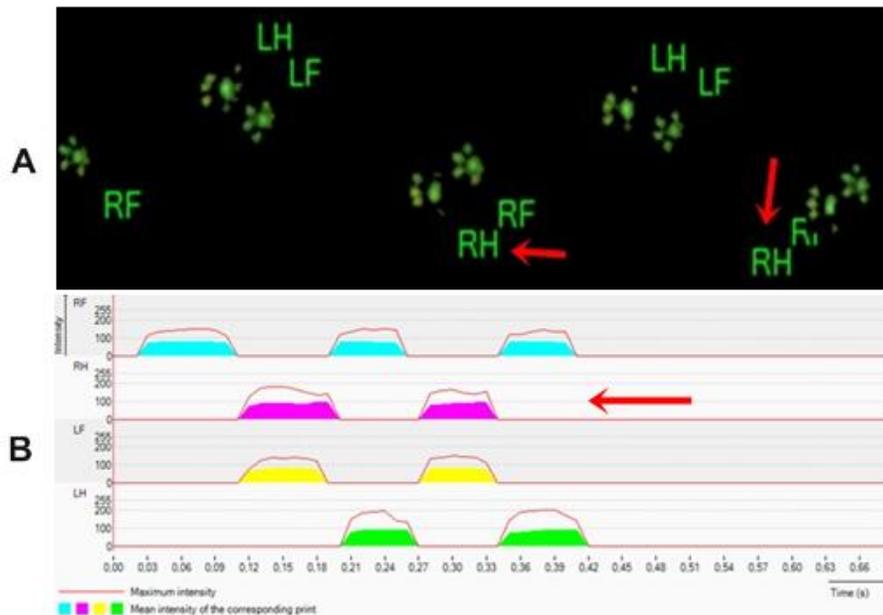


FIGURA 23 – **A:** Padrão de marcha normal; o animal realizou apoio com o MPD em todas as corridas 3 horas após a injeção de solução salina (*NaCl* 0,9%). **B:** *2D footprint intensities* demonstrando intensidade máxima mantida uniformemente em todos os quatro membros.

Os gráficos 3D, gerados a partir da pressão aplicada por cada um dos dedos, permaneceram nulos para os grupos **V** e **VLP** no período de 3h pós-lesão, conforme pode ser observado na FIGURA 24 (gráfico à esquerda), referente ao MPD e classificado pelo software do equipamento como RH (*right hind*). Para os demais grupos, incluindo o **VL**, a intensidade da pisada foi capturada sem alterações visualmente consideráveis, como mostrado na FIGURA 25 (gráfico à esquerda).

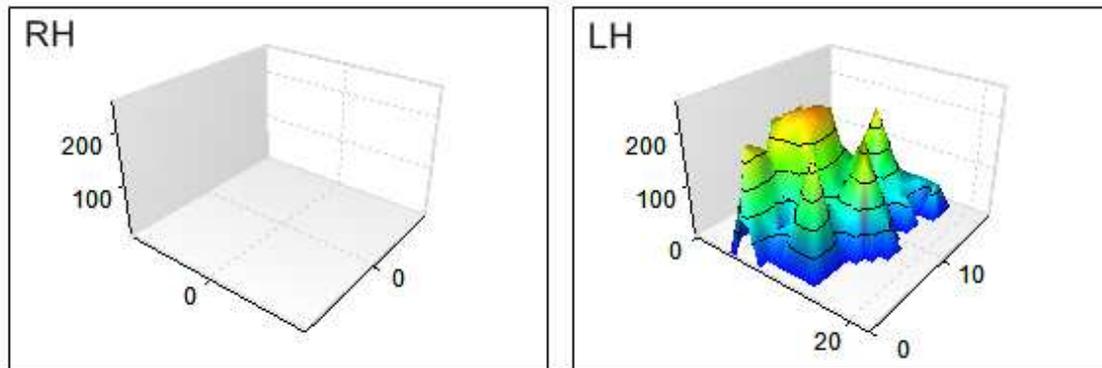


FIGURA 24 – Gráficos 3D mostrando intensidade nula para o membro posterior direito (RH) e a intensidade relativa dos dedos da pata posterior esquerda (LH), caracterizando o padrão de marcha relacionado aos animais dos grupos V e VLP.

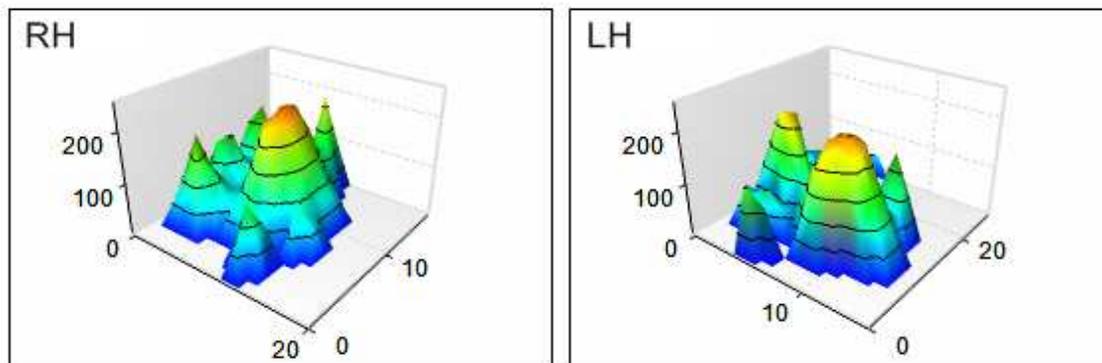


FIGURA 25 – Gráficos 3D mostrando intensidade mantida no membro posterior direito (RH) bem como na pata posterior esquerda (LH), caracterizando o padrão de marcha relacionado aos animais dos grupos S e do grupo submetido à LLLT (VL).

5.1.1 Apoio

A evolução de todos os grupos em relação ao parâmetro *Apoio* pode ser observada no GRÁFICO 1:

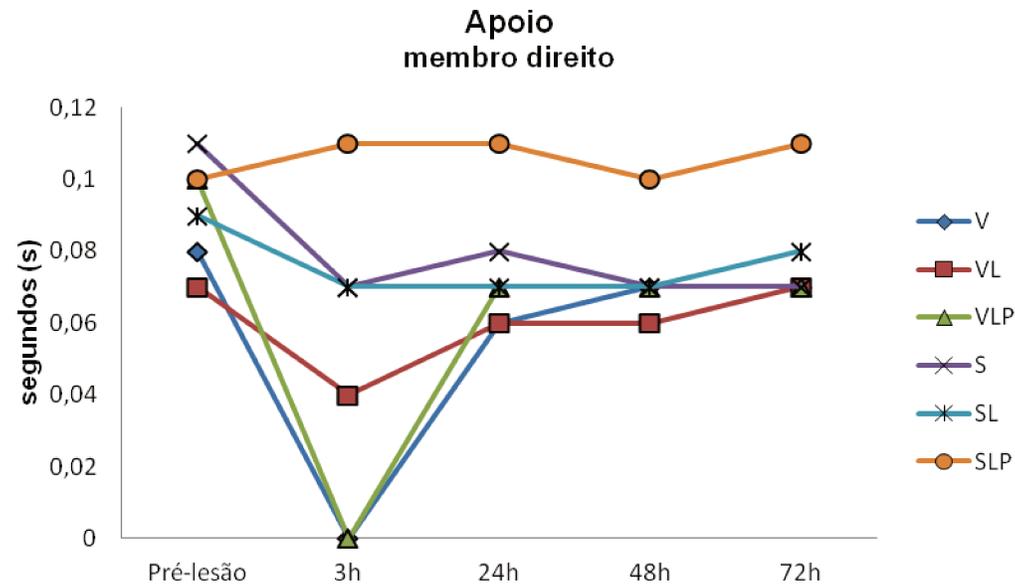


GRÁFICO 1 – Comportamento do parâmetro *Apoio* (em segundos) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise estatística baseada no comportamento individual de cada grupo no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V**, **VLP** e **S**. No grupo **V**, foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h** (GRÁFICO 2). O mesmo comportamento foi observado no grupo **VLP** (GRÁFICO 3).

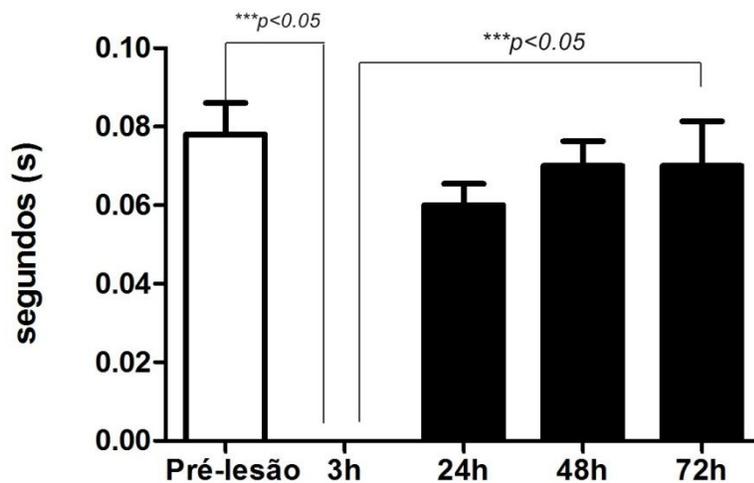


GRÁFICO 2 – Comportamento do *Apoio* (s) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

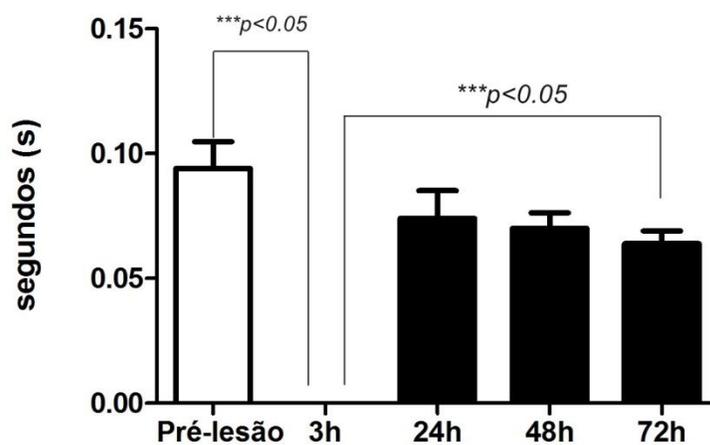


GRÁFICO 3 – Comportamento do *Apoio* (s) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

Para o grupo **S** as diferenças ($p < 0,05$) ocorreram entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **Pré-lesão vs 48h** e **Pré-lesão vs 72h**. Nos demais grupos não foram observadas diferenças significativas entre os períodos de análise (GRÁFICO 4).

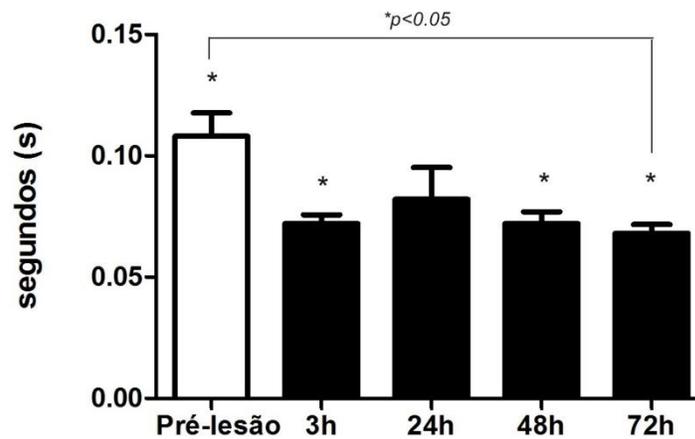


GRÁFICO 4 – Comportamento do *Apoio* (s) para o grupo S nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

O período de 3h pós-lesão foi considerado crítico para o *Apoio* (s) do membro posterior direito. Os animais dos grupos **V** e **VLP** não realizaram apoio do membro. Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Tukey*, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **V vs VL**, **V vs S**, **VL vs VLP**, **VLP vs SLP**, **S vs SLP** e **SL vs SLP**, conforme pode ser observado no GRÁFICO 5:

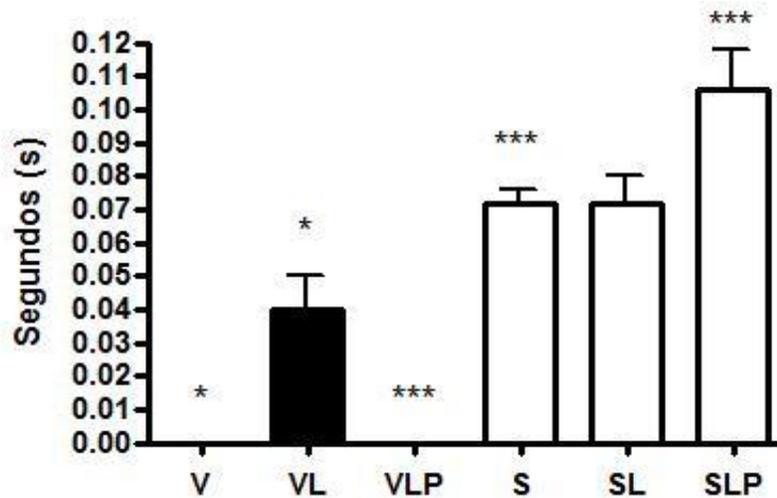


GRÁFICO 5 – Apoio do membro posterior direito 3 horas pós-lesão. Os animais dos grupos V e VLP não realizaram apoio do membro.

Já no período de 24h, seguido pelos períodos de 48 e 72h pós-lesão, não foram mais observadas diferenças entre os grupos experimentais, conforme visualizado no GRÁFICO 6:

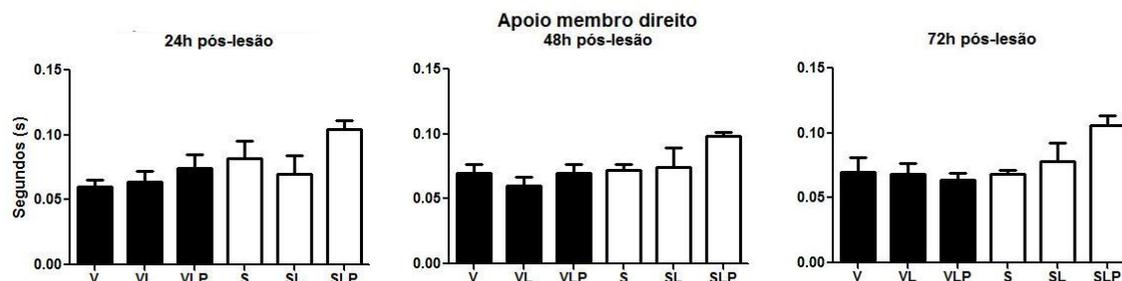


GRÁFICO 6 – Apoio (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

5.1.1.1 Apoio do membro contralateral

A evolução de todos os grupos em relação ao Apoio do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 7:

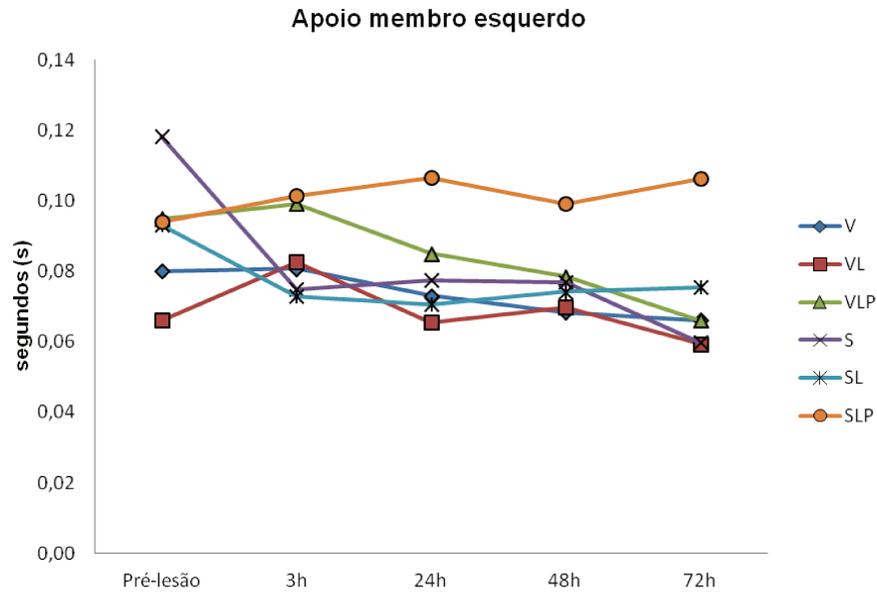


GRÁFICO 7 – Comportamento do *Apoio* (s) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

Foi realizada análise do parâmetro *Apoio* (s) do membro contralateral [membro posterior esquerdo (MPE) – intacto] para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). No grupo **VLP** foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos de **3h vs 72h** ($0,09 \pm 0,01$ X $0,06 \pm 0,006$). Também foi observada diferença ($p < 0,05$) no grupo **S**, na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 72h**. Nos demais grupos não foram observadas alterações significativas do membro esquerdo durante a evolução dos períodos, conforme FIGURA 26:

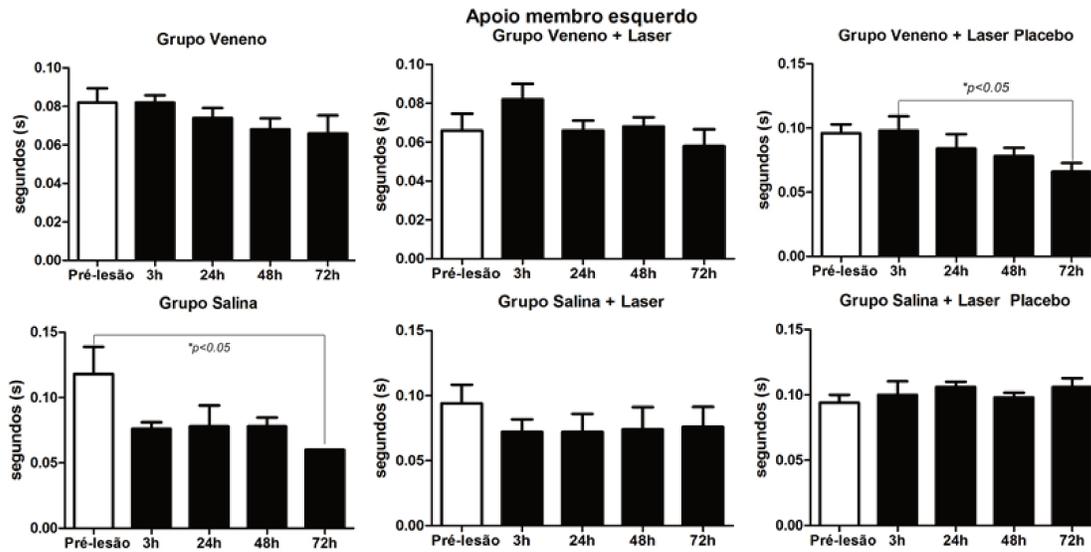


FIGURA 26 – Comportamento do *Apoio* (s) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos grupos VLP e S.

5.1.2 Intensidade máxima

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Intensidade Máxima* (em unidades arbitrárias) pode ser observada no GRÁFICO 8:

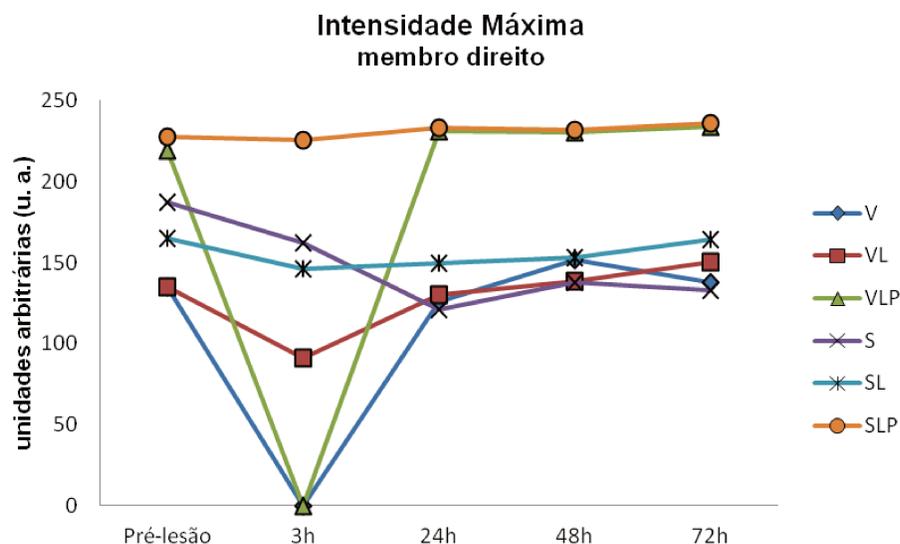


GRÁFICO 8 – Comportamento do parâmetro *Intensidade Máxima* (u.a) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise estatística baseada no comportamento individual de cada grupo, no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V**, **VL**, **VLP** e **S**. No grupo **V**, foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h**, **3h vs 72h** e **24h vs 48h**, conforme observado no GRÁFICO 9:

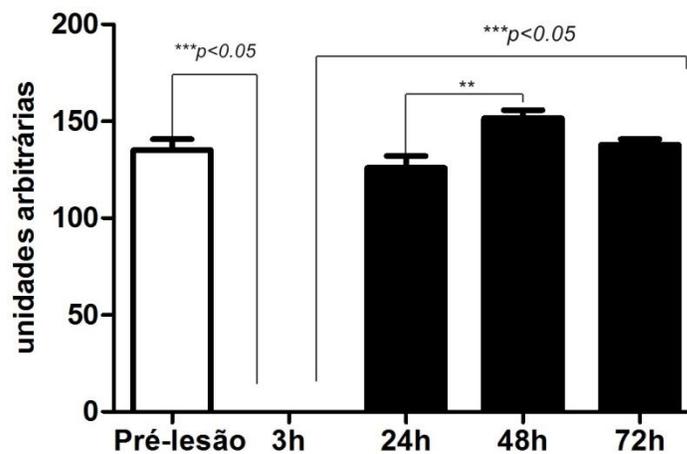


GRÁFICO 9 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

No grupo **VL** houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h** (GRÁFICO 10).

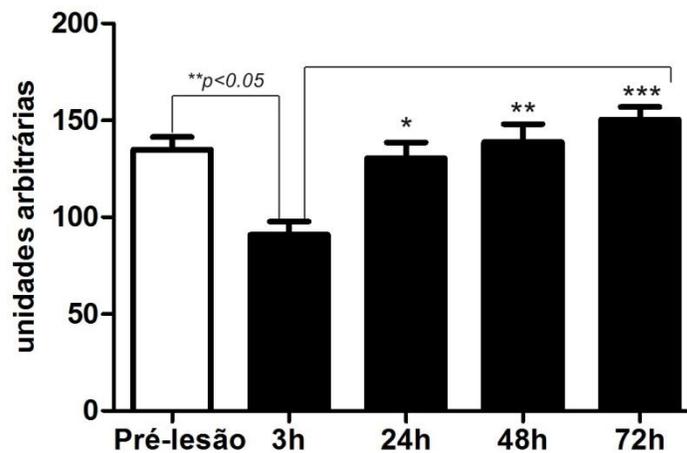


GRÁFICO 10 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) para o grupo VL nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

Para o grupo **VLP**, as diferenças ocorreram entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **Pré-lesão vs 72h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h** (GRÁFICO 11).

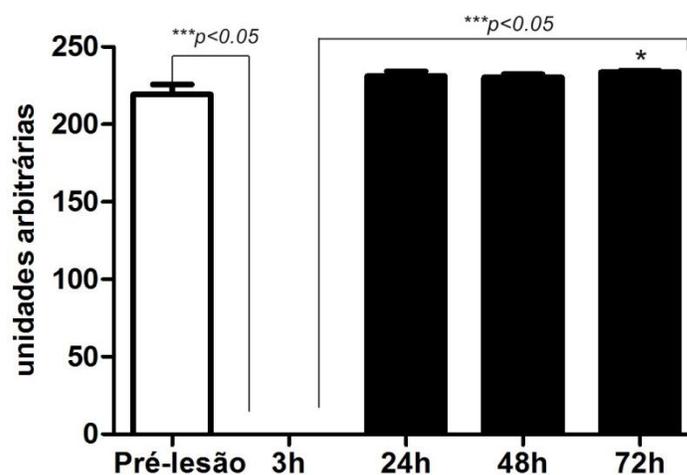


GRÁFICO 11 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

No grupo **S**, foram observadas diferenças entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **Pré-lesão vs 24h**, **Pré-lesão vs 48h**, **Pré-lesão vs 72h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h** (GRÁFICO 12).

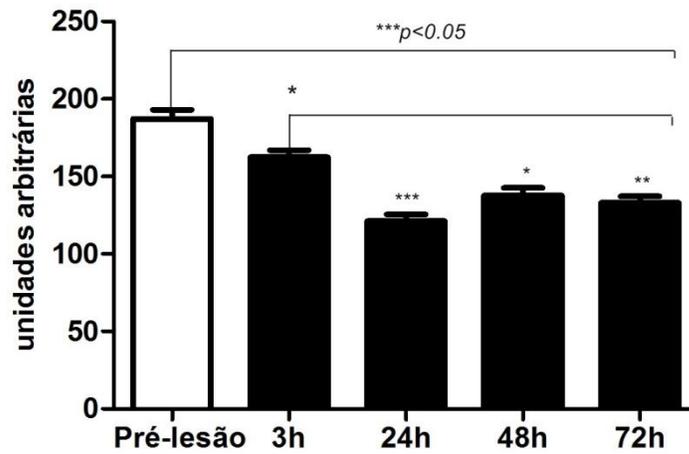


GRÁFICO 12 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) para o grupo S nos diferentes períodos.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **V vs VL**, **V vs S**, **VL vs VLP**, **VLP vs SLP** e **SL vs SLP**. As diferenças entre os grupos podem ser observadas no GRÁFICO 13:

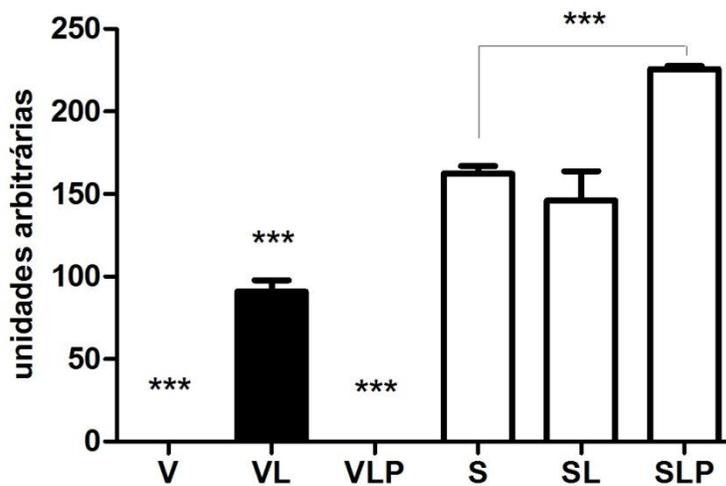


GRÁFICO 13 – *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.

Nos períodos de 24, 48 e 72h pós-lesão foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **V vs VLP**, **VL vs VLP**, **S vs SLP** e **SL vs SLP**, conforme GRÁFICO 14:

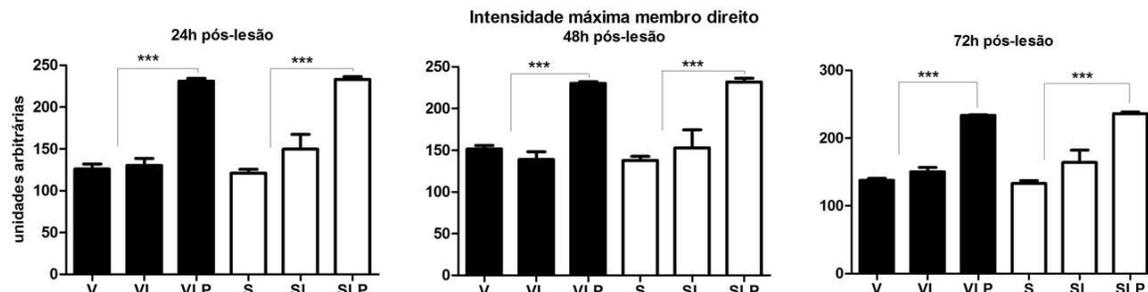


GRÁFICO 14 – *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.

5.1.2.1 *Intensidade máxima do membro contralateral*

A evolução de todos os grupos em relação à *Intensidade Máxima* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 15:

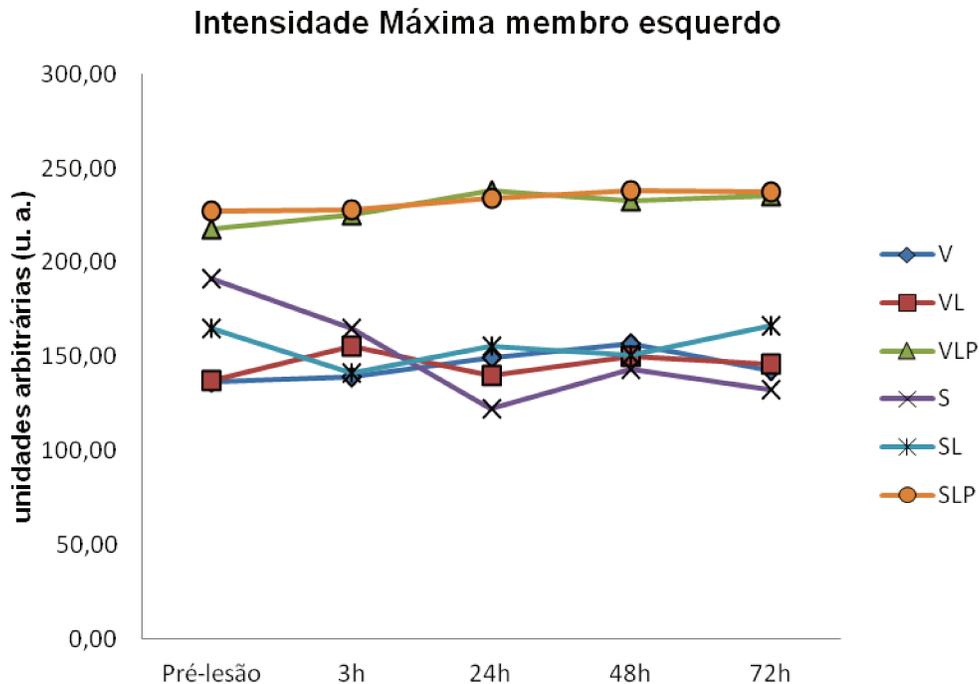


GRÁFICO 15 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

Foi realizada análise da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). Foram observadas diferenças nos grupos **VLP** e **S**. No grupo **VLP** foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos **Pré-lesão** vs **24h**. Para o grupo **S** foram observadas diferenças entre os períodos **Pré-lesão** vs **3h**, **Pré-lesão** vs **24h**, **Pré-lesão** vs **48h**, **Pré-lesão** vs **72h**, **3h** vs **24h** e **3h** vs **72h**, conforme FIGURA 27:

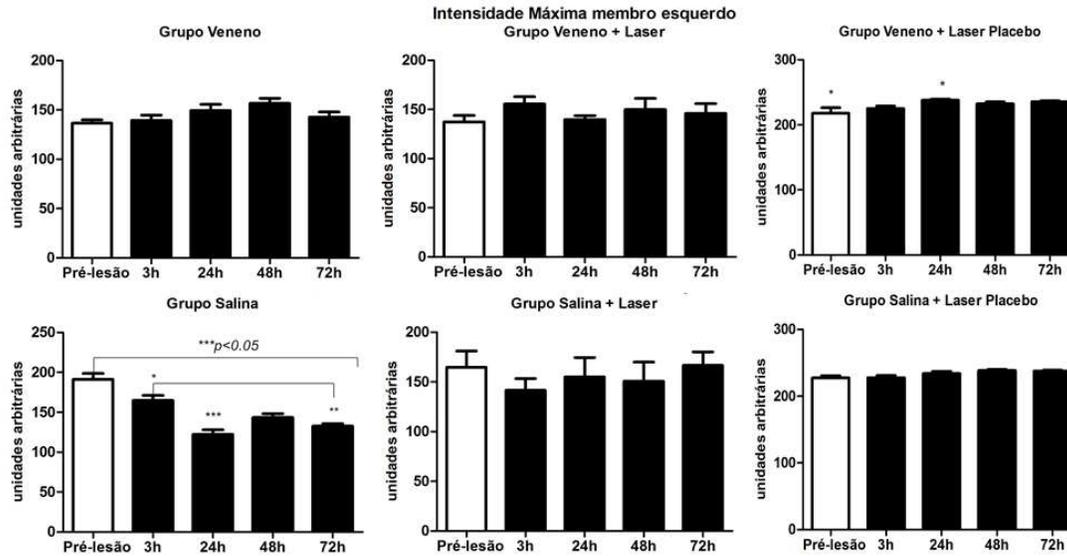


FIGURA 27 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos grupos VLP e S.

5.1.3 Balanço

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Balanço* (em segundos) pode ser observada no GRÁFICO 16:

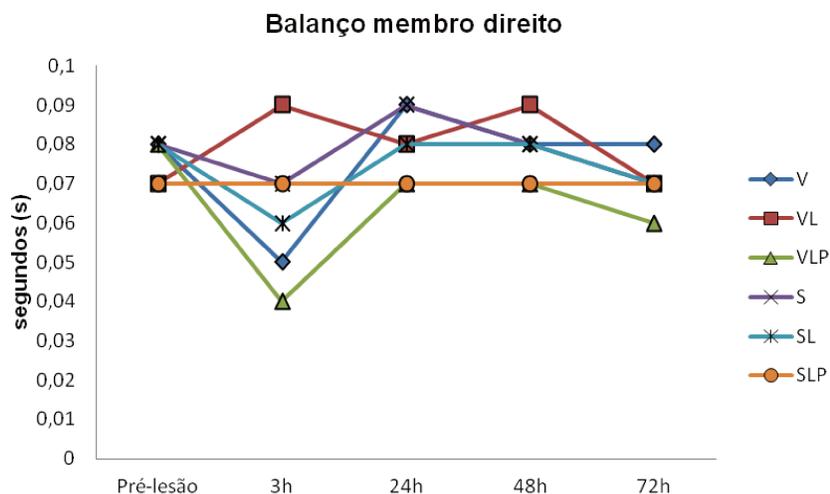


GRÁFICO 16 – Comportamento do parâmetro *Balanço* (s) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise estatística baseada no comportamento individual do *Balanço* (s) de cada grupo, no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas apenas no grupo **SL**. Foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **3h vs 24h** e **3h vs 48h**, conforme observado no GRÁFICO 17:

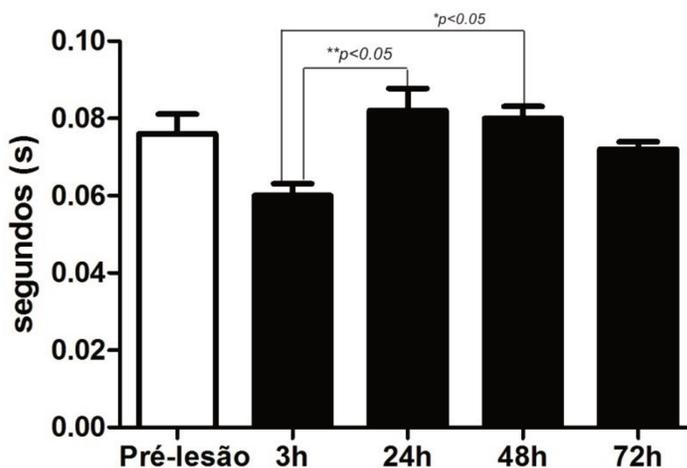


GRÁFICO 17 – Comportamento do *Balanço* (s) para o grupo SL nos diferentes períodos. Nos demais grupos não foram observadas diferenças entre os períodos.

Não foram observadas diferenças entre os grupos nos períodos de 3, 24 e 72 horas pós-lesão. No período de 48h foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **VL** vs **VLP** e **VL** vs **SLP**, conforme FIGURA 28:

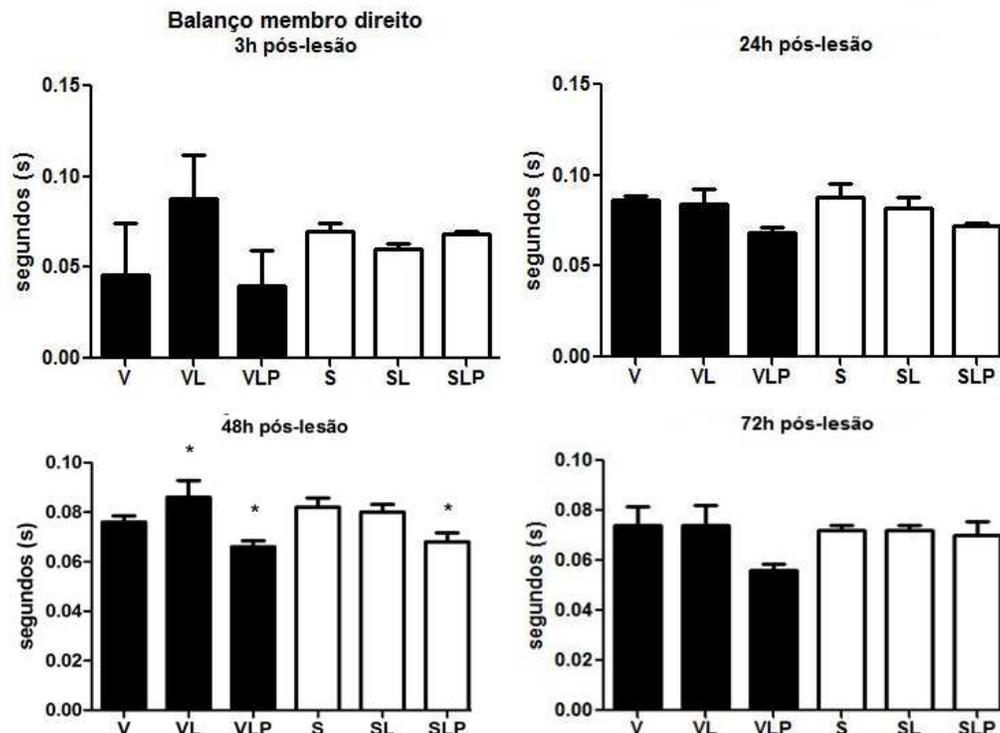


FIGURA 28 – *Balanço* (s) do membro posterior direito 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão nos diferentes grupos de tratamento.

5.1.3.1 *Balanço do membro contralateral*

A evolução de todos os grupos em relação ao *Balanço* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 18:

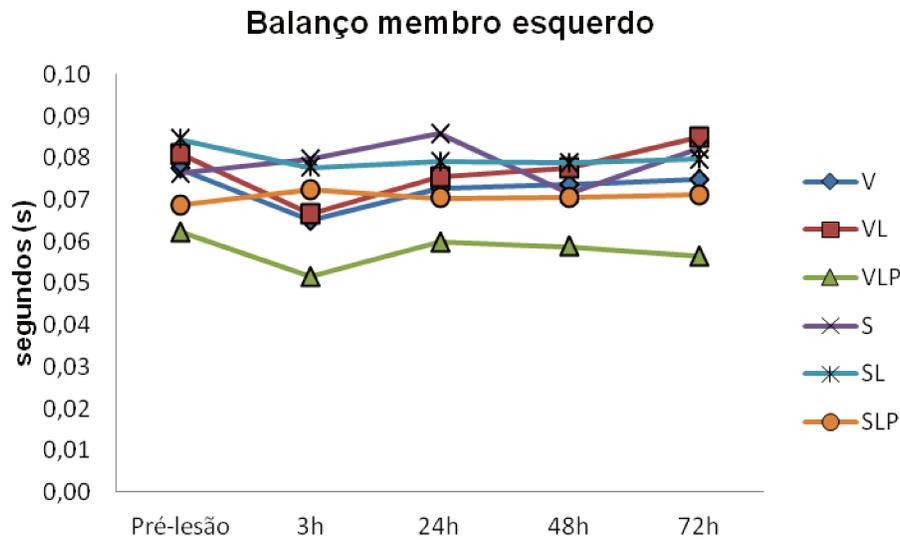


GRÁFICO 18 – Comportamento do *Balanço* (s) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise do parâmetro *Balanço* (s) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão) não revelou diferenças significativas, conforme FIGURA 29:

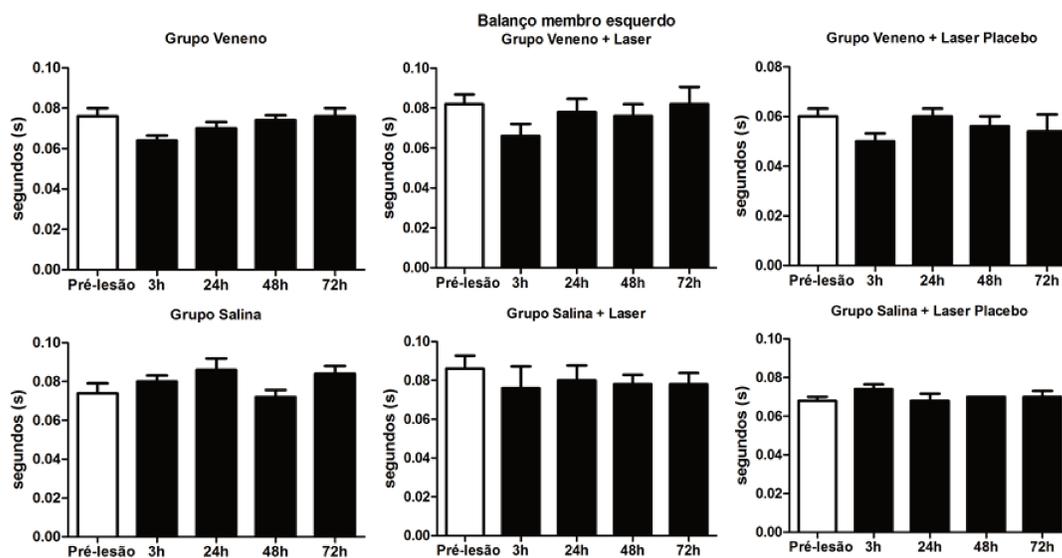


FIGURA 29 – Comportamento do *Balanço* (s) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Não foram observadas diferenças em nenhuma das comparações.

5.1.4 Velocidade do balanço

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Velocidade do Balanço* (em centímetros por segundo) pode ser observada no GRÁFICO 19:

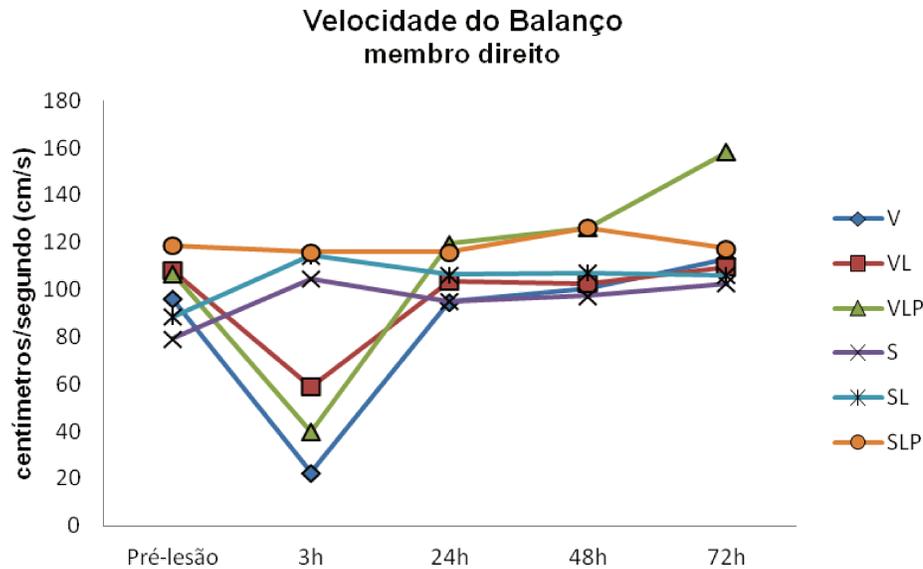


GRÁFICO 19 – Comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise estatística baseada no comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) de cada grupo, no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V** e **VLP**. Em ambos os grupos foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h**, conforme observado nos GRÁFICOS 20 e 21:

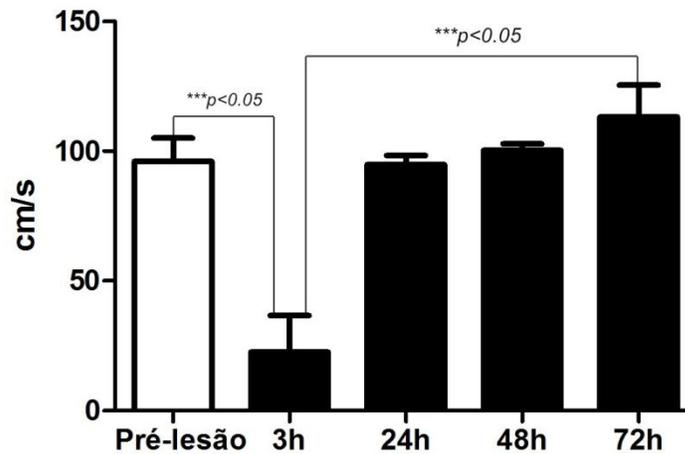


GRÁFICO 20 – Comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

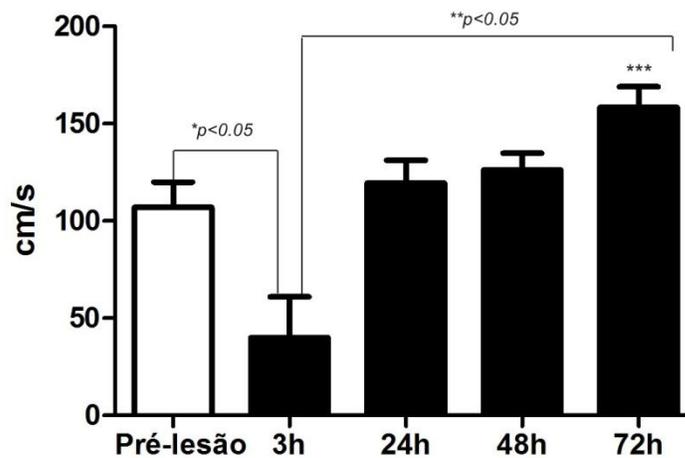


GRÁFICO 21 – Comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação da *Velocidade do Balanço* (cm/s) entre os grupos **V vs S**, **V vs SL**, **V vs SLP**, **VLP vs S**, **VLP vs SL** e **VLP vs SLP** no período de 3h pós-lesão. Para o período de 72h pós-lesão foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **V vs VLP**, **VL vs VLP**, **VLP vs S** e **VLP vs SL**. Já para os períodos de 24 e 48h pós-lesão, não foram observadas diferenças entre os grupos, conforme ilustrado na FIGURA 30:

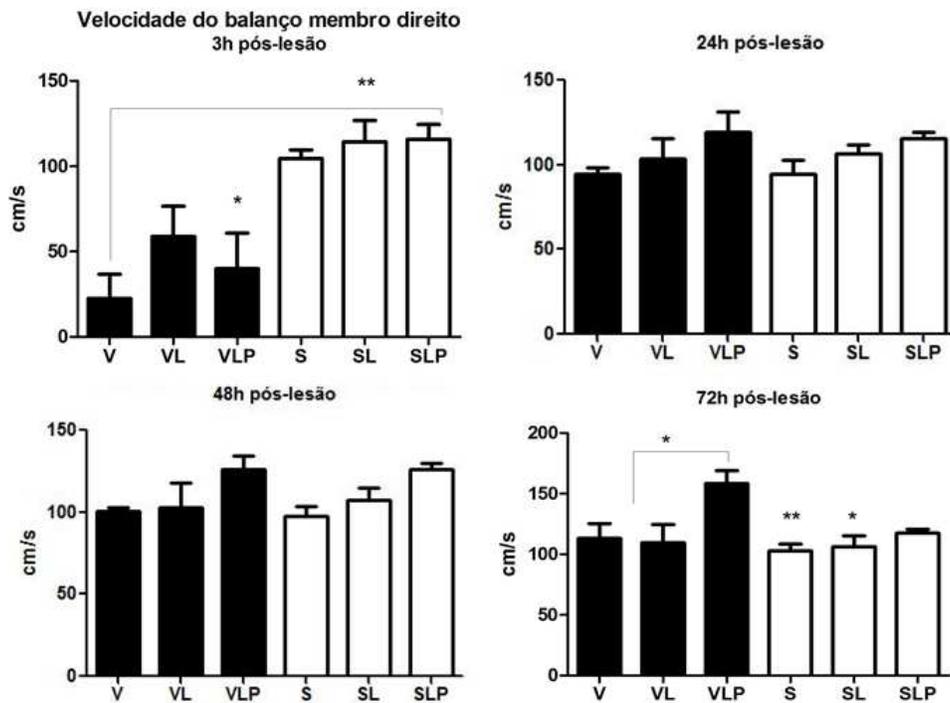


FIGURA 30 – Velocidade do Balanço (cm/s) do membro posterior direito 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão.

5.1.4.1 Velocidade do Balanço do membro contralateral

A evolução de todos os grupos em relação à *Velocidade do Balanço* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 22:

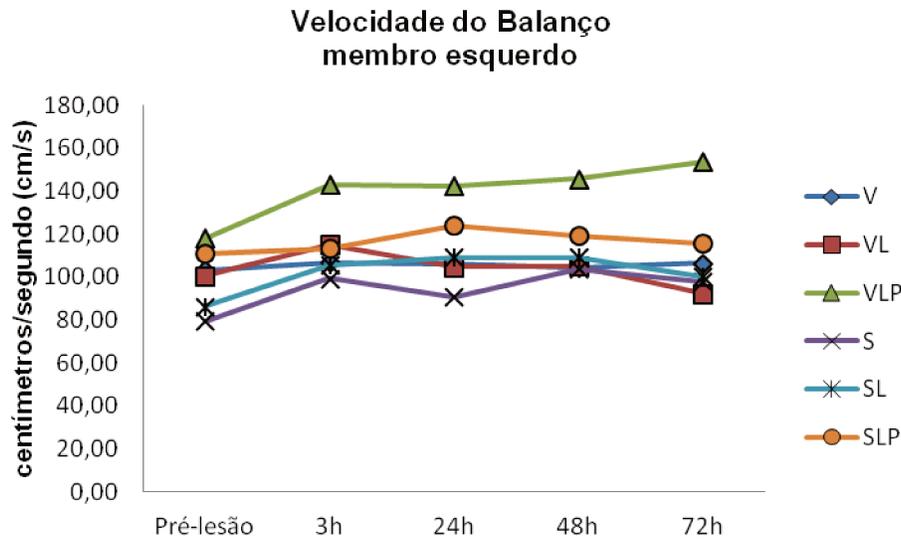


GRÁFICO 22 – Comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise do parâmetro *Velocidade do Balanço* (cm/s) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão) não revelou diferenças significativas, conforme FIGURA 31:

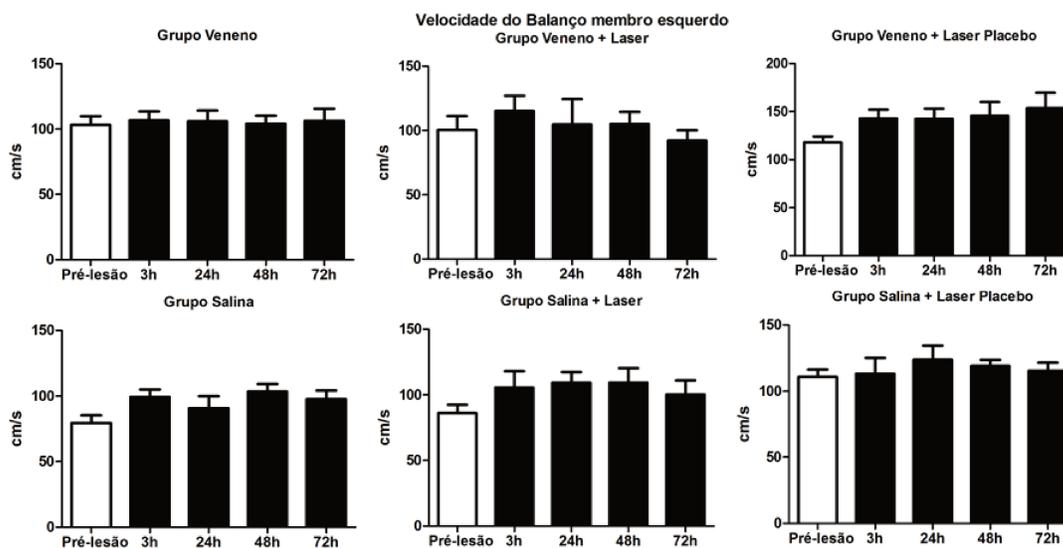


FIGURA 31 – Comportamento da *Velocidade do Balanço* (cm/s) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Não foram observadas diferenças em nenhuma das comparações.

5.1.5 Comprimento da passada

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Comprimento da Passada* (em centímetros) pode ser observada no GRÁFICO 23:

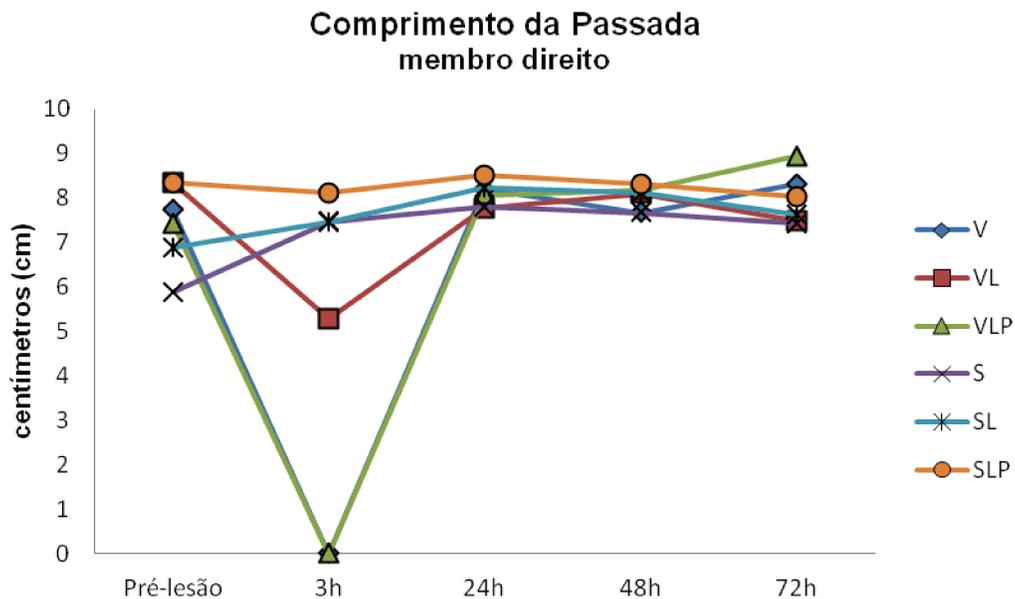


GRÁFICO 23 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise estatística baseada no comportamento individual do *Comprimento da Passada* (cm) de cada grupo, no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V**, **VLP** e **S**. No grupo **V** foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão** vs **3h**, **3h** vs **24h**, **3h** vs **48h** e **3h** vs **72h**, conforme observado no GRÁFICO 24:

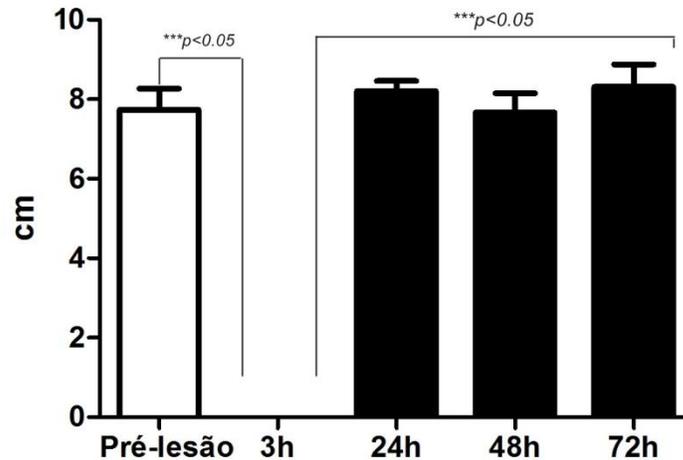


GRÁFICO 24 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão

Para o grupo **VLP**, as diferenças ocorreram entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h**, como pode ser visualizado no GRÁFICO 25:

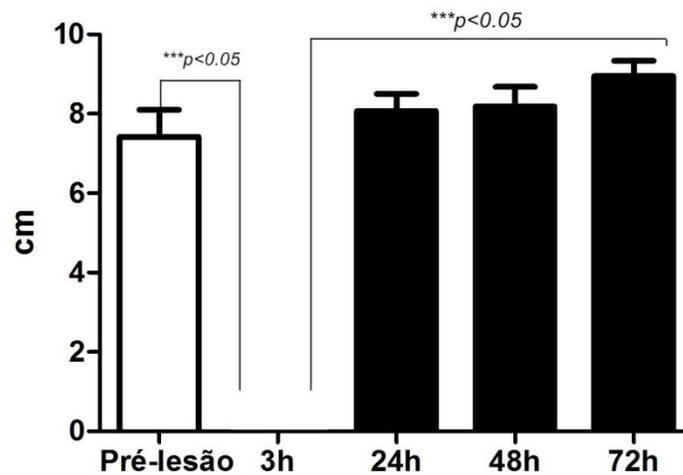


GRÁFICO 25 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

O grupo **S**, apresentou diferença significativa entre os períodos **Pré-lesão vs 24h** e **Pré-lesão vs 48h**, conforme ilustrado no GRÁFICO 26:

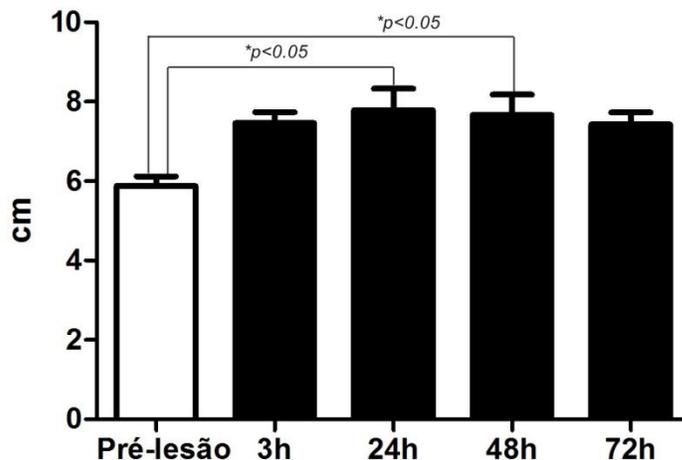


GRÁFICO 26 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) para o grupo S nos diferentes períodos.

Na análise intergrupos no período de 3h pós-lesão, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no *Comprimento da Passada* (cm) na comparação entre os grupos **V vs VL**, **V vs S**, **V vs SL**, **V vs SLP**, **VL vs VLP**, **VLP vs S**, **VLP vs SL** e **VLP vs SLP**, conforme visualizado no GRÁFICO 27:

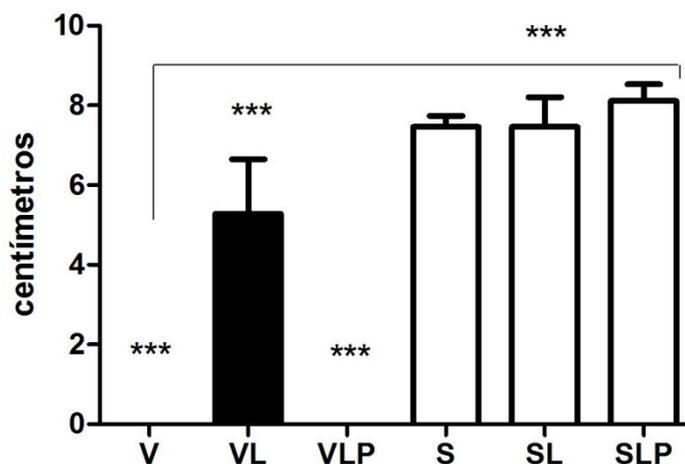


GRÁFICO 27 – *Comprimento da Passada* (cm) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.

Nos períodos de 24, 48 e 72h pós-lesão não foi mais observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme o GRÁFICO 28:

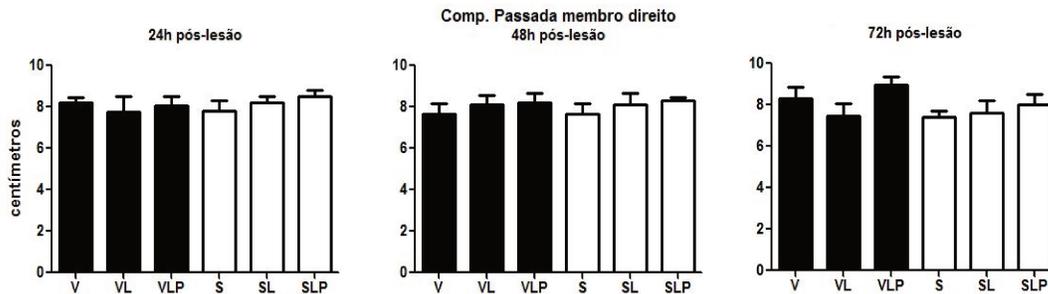


GRÁFICO 28 – Comprimento da Passada (cm) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.

5.1.5.1 Comprimento da passada do membro contralateral

A evolução de todos os grupos em relação ao *Comprimento da Passada* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 29:

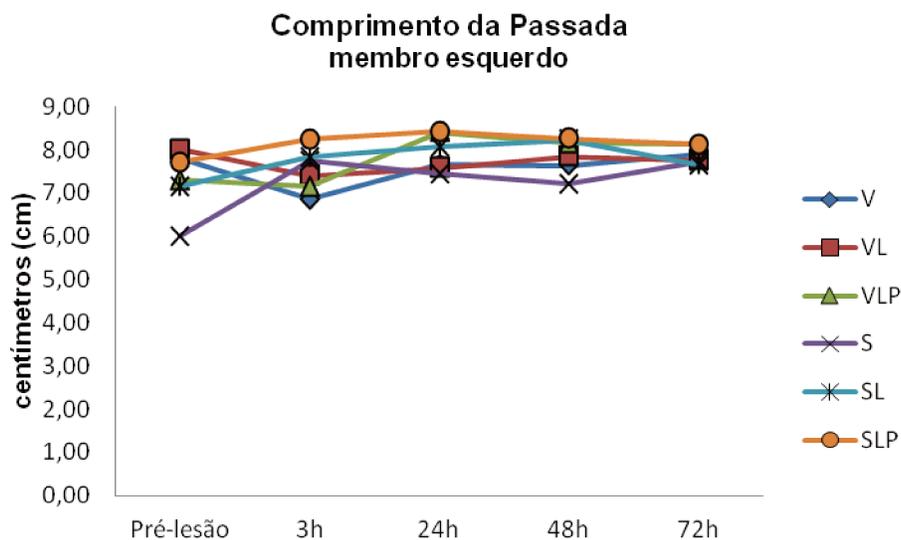


GRÁFICO 29 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

Foi realizada análise do *Comprimento da Passada* (cm) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) (por meio do *teste-t*) apenas no grupo **S**, na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h** ($5,99 \pm 0,19 \times 7,74 \pm 0,34$), **Pré-lesão vs 24h** ($5,99 \pm 0,19 \times 7,44 \pm 0,45$) e **Pré-lesão vs 72h** ($5,99 \pm 0,19 \times 7,73 \pm 0,65$), conforme FIGURA 32:

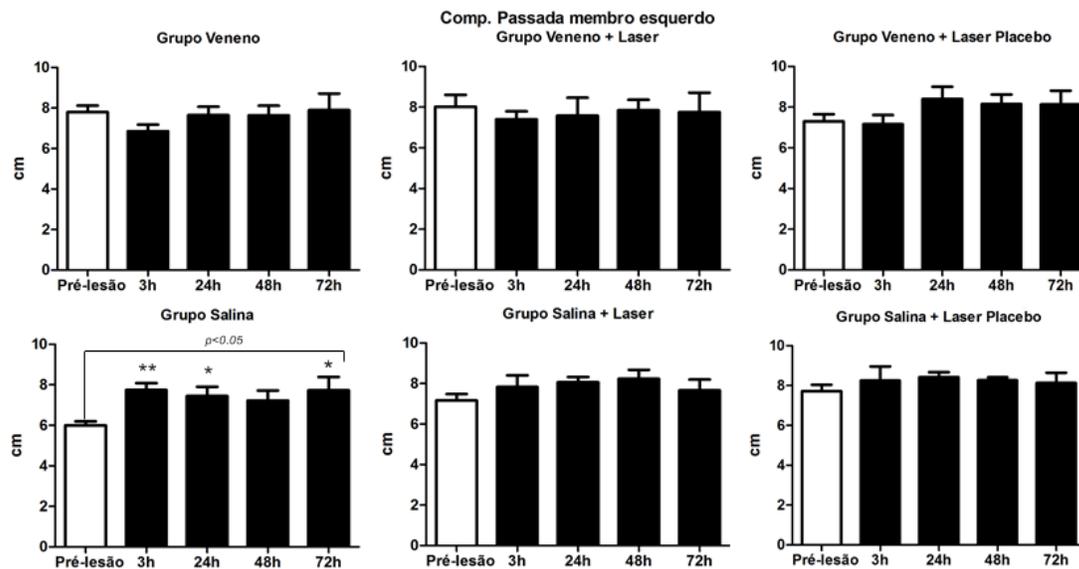


FIGURA 32 – Comportamento do *Comprimento da Passada* (cm) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no grupo S.

5.1.6 Ciclo do passo

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Ciclo do Passo* (em segundos) pode ser observada no GRÁFICO 30:

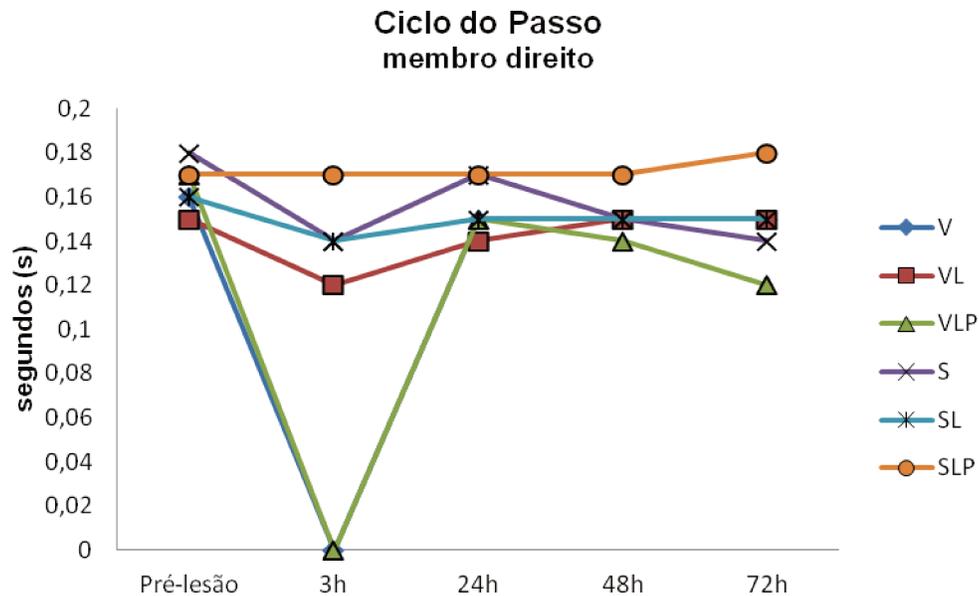


GRÁFICO 30 – Comportamento do *Ciclo do Passo* (s) do membro direito nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

A análise baseada no comportamento individual do *Ciclo do Passo* (s) de cada grupo, no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V** e **VLP**. Em ambos os grupos foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h**, conforme observado nos GRÁFICOS 31 e 32:

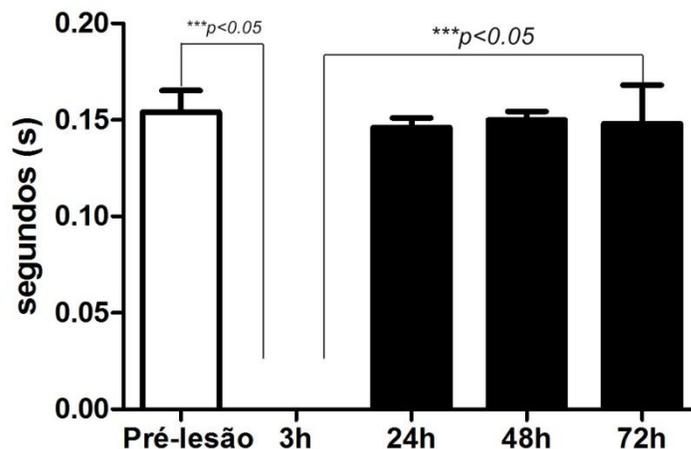


GRÁFICO 31 – Comportamento do *Ciclo do Passo* (s) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

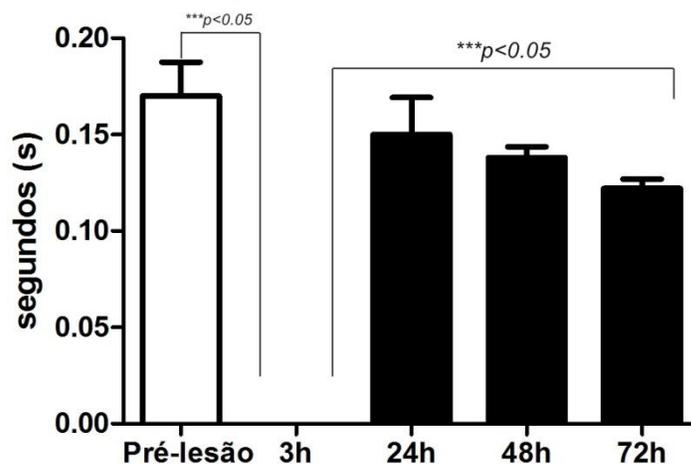


GRÁFICO 32 – Comportamento do *Ciclo do Passo* (s) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

No período de 3h pós-lesão foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no *Ciclo do Passo* (s) na comparação entre os grupos **V vs VL**, **V vs S**, **V vs SL**, **V vs SLP**, **VL vs VLP**, **VLP vs S**, **VLP vs SL** e **VLP vs SLP**, conforme ilustrado no GRÁFICO 33:

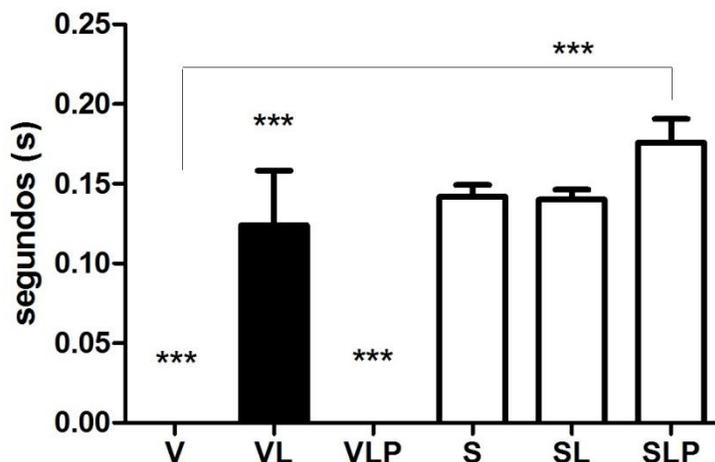


GRÁFICO 33 – *Ciclo do Passo* (s) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.

Nos períodos de 24 e 48h pós-lesão não foi mais observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Já no período de 72h pós-lesão, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **VLP** vs **SLP**, conforme o GRÁFICO 34:

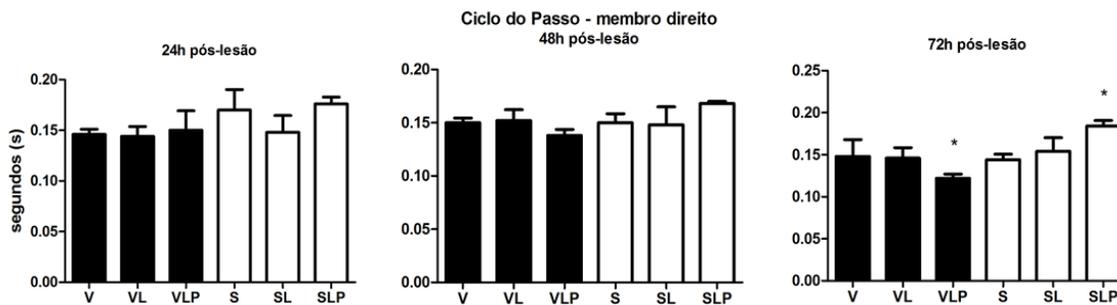


GRÁFICO 34 – *Ciclo do Passo* (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.

5.1.6.1 *Ciclo do passo do membro contralateral*

A evolução de todos os grupos em relação ao *Ciclo do Passo* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 35:

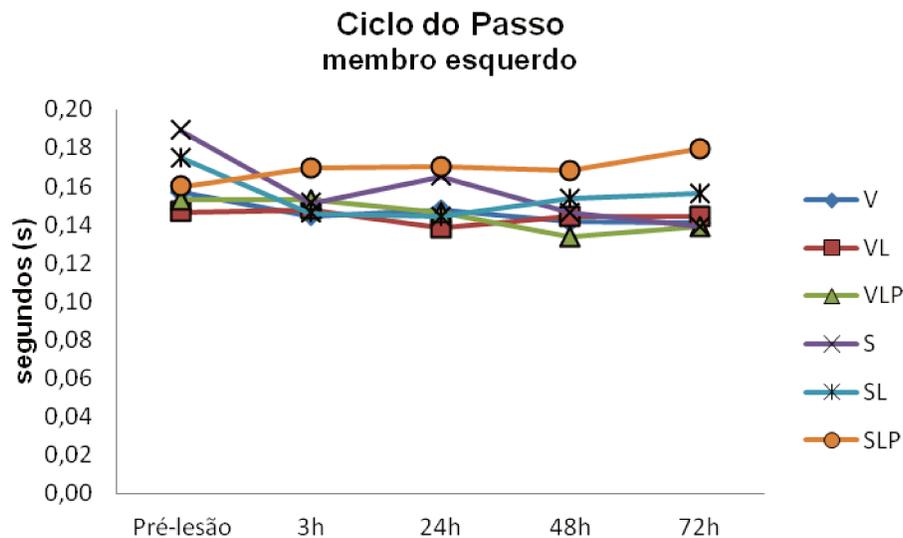


GRÁFICO 35 – Comportamento do *Ciclo do Passo* (s) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

Foi realizada análise do *Ciclo do Passo* (s) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) (por meio do *teste-t*) apenas no grupo **S**, na comparação entre os períodos **Pré-lesão** vs **72h** ($0,19 \pm 0,02$ X $0,14 \pm 0,004$), conforme FIGURA 33:

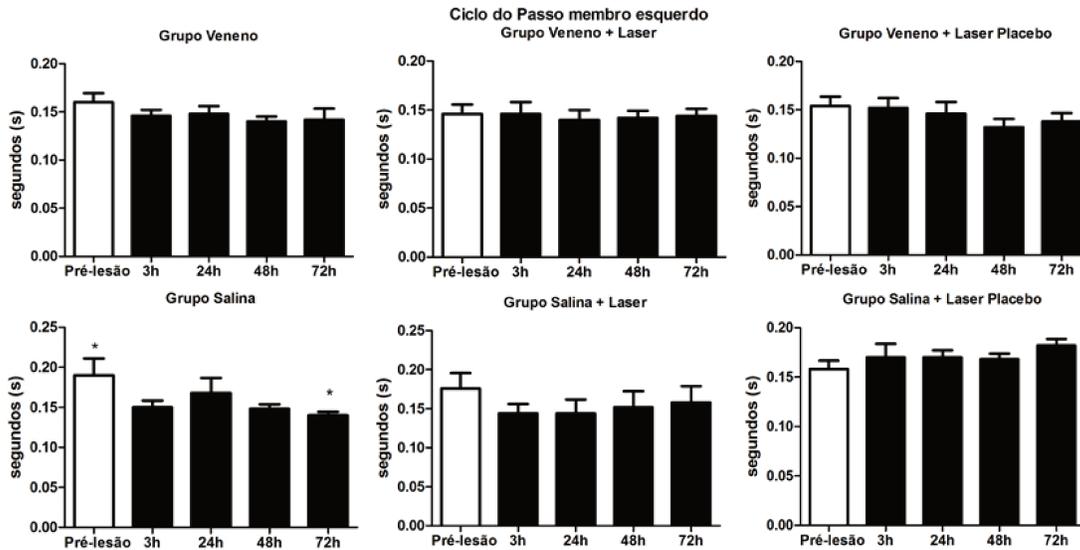


FIGURA 33 – Comportamento do *Ciclo do Passo* (s) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no grupo S.

5.1.7 Apoio único

A evolução dos grupos em relação ao parâmetro *Apoio Único* (em segundos) pode ser observada no GRÁFICO 36:

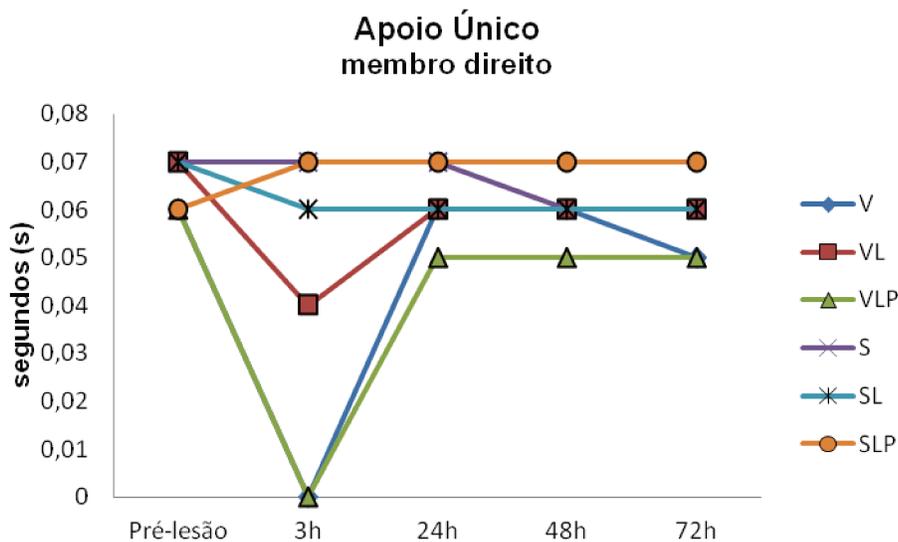


GRÁFICO 36 – Comportamento do *Apoio Único* (s) nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

O comportamento individual de cada grupo com relação ao parâmetro *Apoio Único* (s), no decorrer dos diferentes períodos de tempo, revelou diferenças significativas nos grupos **V**, **VL** e **VLP**. Nos grupos **V** e **VLP** foi observada diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h**, **3h vs 48h** e **3h vs 72h**, conforme observado nos GRÁFICOS 37 e 38:

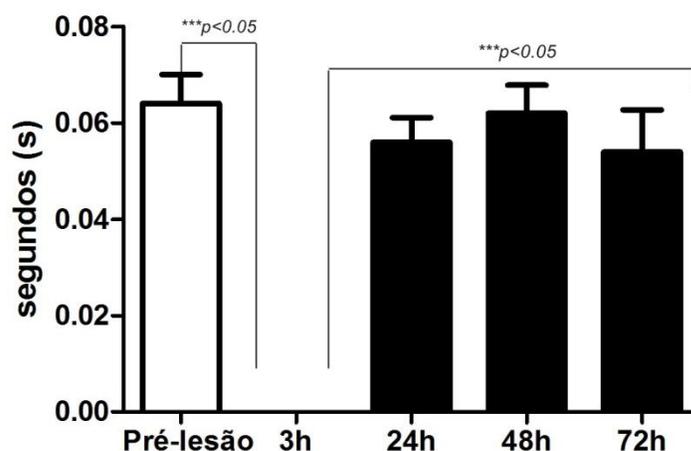


GRÁFICO 37 – Comportamento do *Apoio Único* (s) para o grupo V nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

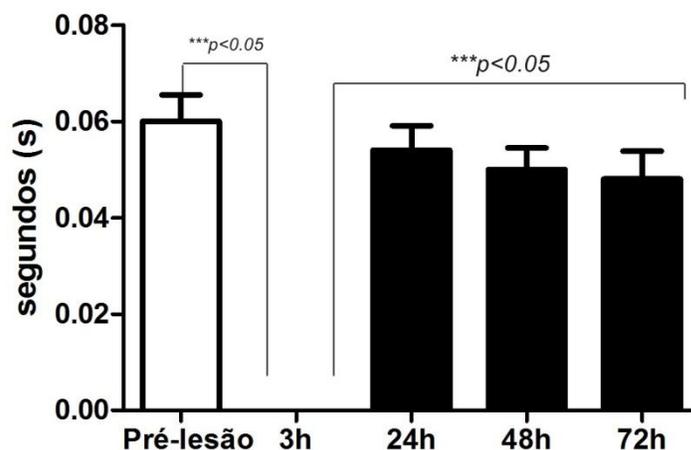


GRÁFICO 38 – Comportamento do *Apoio Único* (s) para o grupo VLP nos diferentes períodos. As diferenças concentram-se no período de 3h pós-lesão.

No grupo **VL** foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação dos períodos **Pré-lesão vs 3h**, de acordo com o GRÁFICO 39:

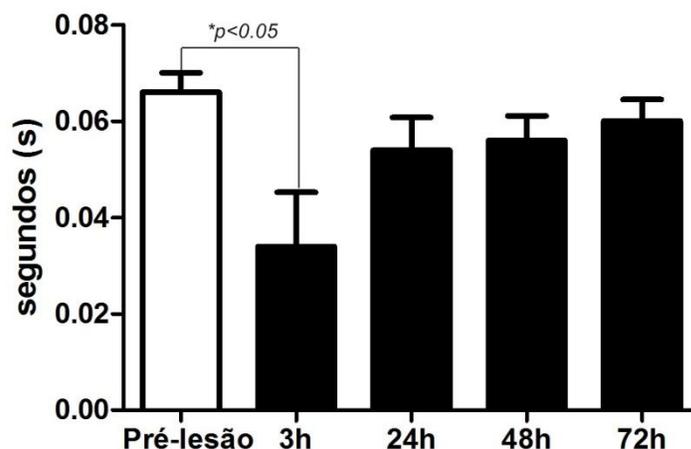


GRÁFICO 39 – Comportamento do Apoio Único (s) para o grupo VL nos diferentes períodos.

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no Apoio Único (s) 3h pós-lesão na comparação entre os grupos **V vs VL**, **V vs S**, **V vs SL**, **V vs SLP**, **VL vs VLP**, **VL vs S**, **VL vs SL**, **VL vs SLP**, **VLP vs S**, **VLP vs SL**, **VLP vs SLP**, conforme GRÁFICO 40:

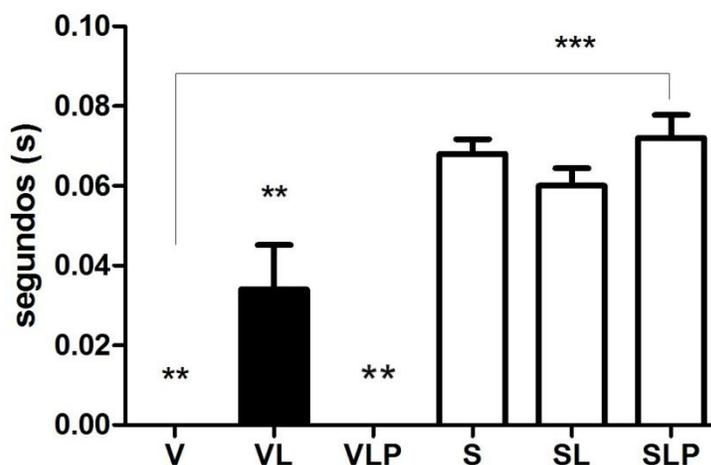


GRÁFICO 40 – Apoio Único (s) do membro posterior direito 3 horas pós-lesão.

Nos períodos de 24, 48 e 72h pós-lesão não foi mais observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme o GRÁFICO 41:

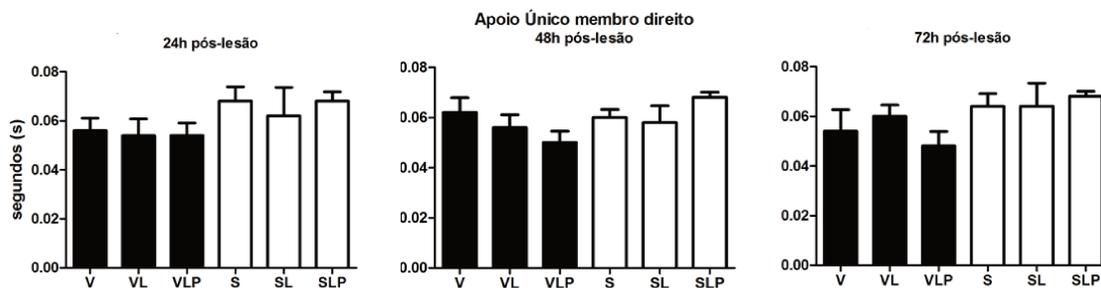


GRÁFICO 41 – *Apoio Único* (s) do membro posterior direito 24, 48 e 72 horas pós-lesão.

5.1.7.1 *Apoio Único do membro contralateral*

A evolução de todos os grupos em relação ao *Apoio Único* do membro esquerdo pode ser observada no GRÁFICO 42:

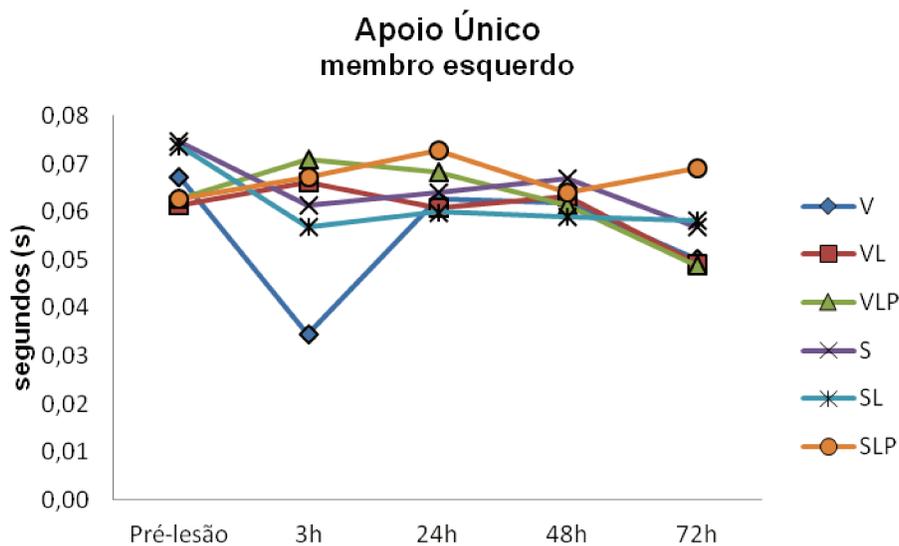


GRÁFICO 42 – Comportamento do *Apoio Único* (s) do membro esquerdo nos diferentes grupos experimentais no decorrer dos períodos.

Foi realizada análise do *Apoio Único* (s) do membro contralateral para cada um dos grupos experimentais (**V**, **VL**, **VLP**, **S**, **SL** e **SLP**) no decorrer dos diferentes períodos de tratamento (pré-lesão, 3, 24, 48 e 72 horas pós-lesão). Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nos grupos **V** e **VLP**. No grupo **V** houve diferença na comparação entre os períodos **Pré-lesão vs 3h**, **3h vs 24h** e **3h vs 48h**. Já no grupo **VLP**, foi observada diferença apenas entre os períodos **3h vs 72h**, conforme FIGURA 34:

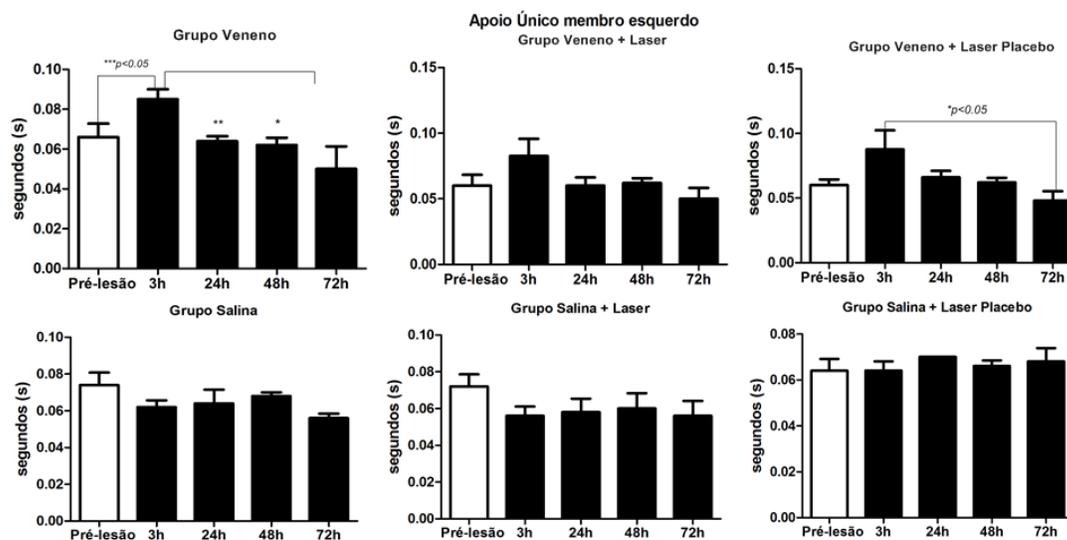


FIGURA 34 – Comportamento do *Apoio Único* (s) do membro contralateral (esquerdo/intacto) no decorrer dos diferentes períodos. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos grupos V e VLP.

5.2 Expressão gênica

A partir da aplicação do programa *BestKeeper* para escolha do melhor *housekeeping*, foi possível observar que o gene *Rps29* apresentou expressão mais estável entre os diferentes grupos de tratamento, portanto, a expressão relativa dos genes *MyoD*, *Miogenina* e *Pax7* foi normalizada pelo *housekeeping*

Rps29.

Não foram observadas diferenças significativas na comparação da expressão relativa de *MyoD* entre os diferentes grupos experimentais, conforme pode ser observado no GRÁFICO 43:

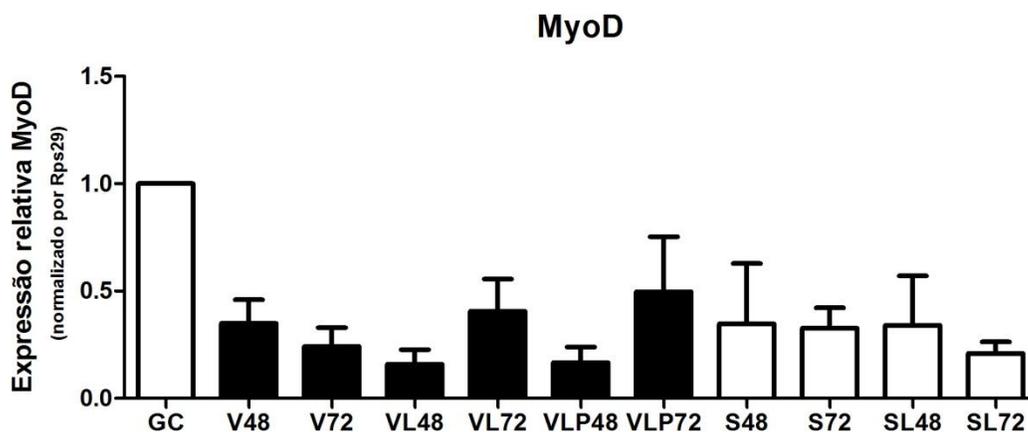


GRÁFICO 43 - Expressão relativa de *MyoD*. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão relativa de *Miogenina* na comparação entre os grupos **V72 vs VL72** ($0,14 \pm 0,07 \times 1,67 \pm 0,26$) ($V72 = 0,23$ vezes \times $VL72 = 1,67$ vezes) e **VL72 vs VLP72** ($1,67 \pm 0,26 \times 0,06 \pm 0,04$) ($VL72 = 1,67$ vezes \times $VLP72 = 0,06$ vezes) conforme pode ser observado no GRÁFICO 44. Entre os demais grupos de tratamento, não foram observadas diferenças significativas.

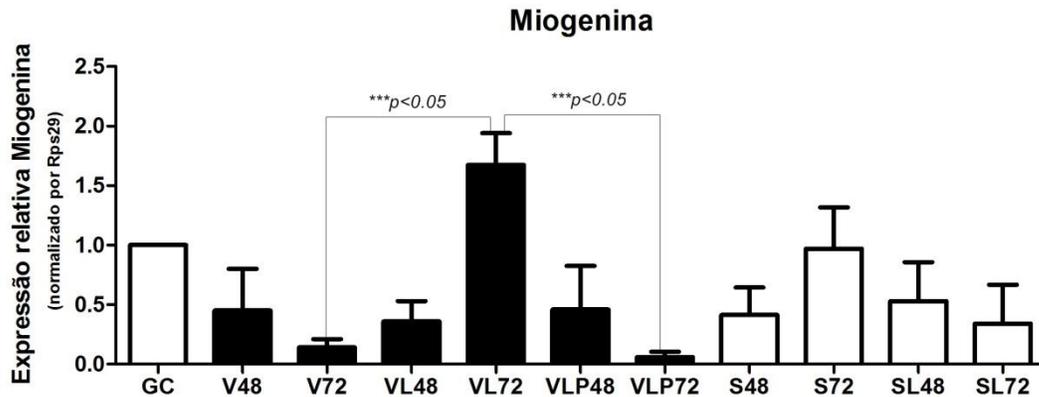


GRÁFICO 44 - Expressão relativa de *Miogenina*. Houve diferença significativa ($p<0,05$) na comparação entre os grupos V72 e VL72.

Na comparação da expressão relativa de *Pax7* entre os diferentes grupos de tratamento, observou-se que houve diminuição significativa ($p<0,05$) da expressão em todos os grupos experimentais comparados ao **GC**, exceto para o grupo **SL72**, conforme ilustrado no GRÁFICO 45:

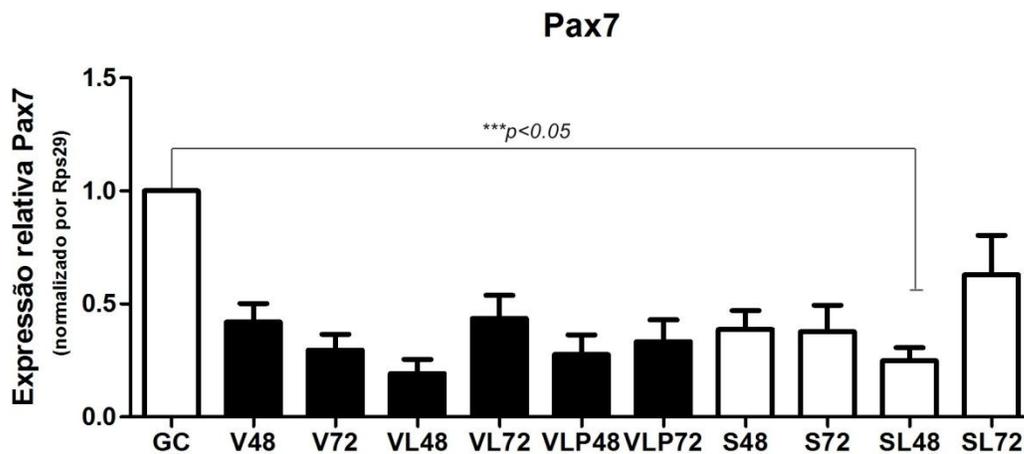


GRÁFICO 45 - Expressão relativa de *Pax7*. Houve redução significativa ($p<0,05$) da expressão em todos os grupos experimentais em relação ao controle, exceto para o grupo SL72.

5.3 Estudo morfológico e morfométrico

Os grupos **S** (S48, S72, SLP48 e SLP72) apresentaram comportamento similar ao grupo **GC** (intacto) (FIGURA 35). Nos cortes histológicos foi possível observar presença de extenso infiltrado inflamatório tanto nos grupos **V** (V48 e V72) quanto nos grupos **VL** (VL48 e VL72). Os grupos **VLP48** e **VLP72** apresentaram aspectos morfológicos similares aos grupos **V**. Nos períodos de 48 e 72h pós-lesão não foi observada presença de miotubos, conforme FIGURA 36:

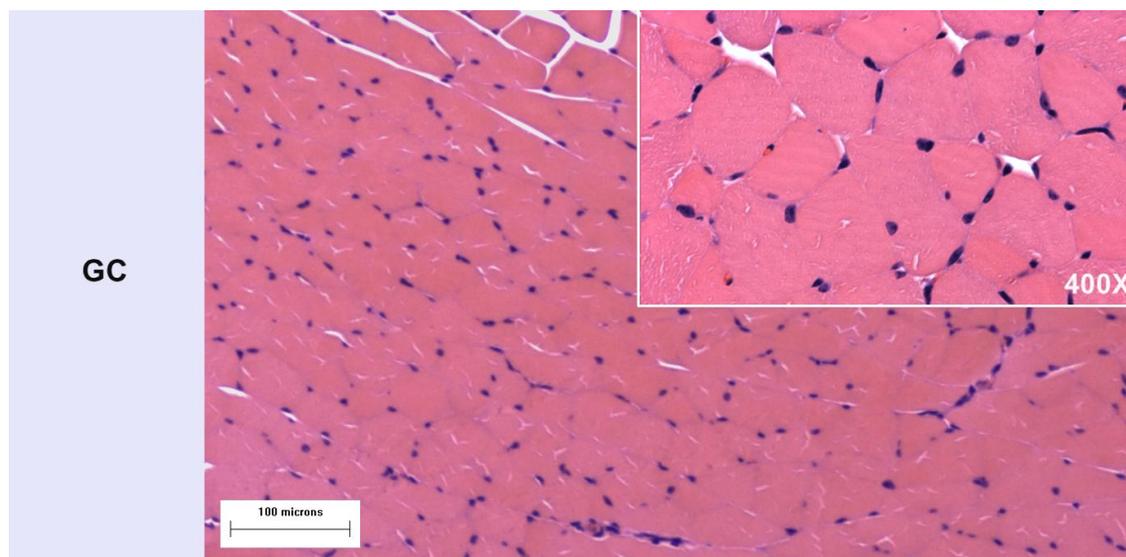


FIGURA 35 – Corte transversal corado por H&E do grupo controle (GC), em ampliação de 100 e 400X (detalhe). Os grupos S48, S72, SL48, SL72, SLP48 e SLP72 apresentaram mesmo aspecto das fibras musculares. A perfuração provocada pela injeção de NaCl 0,9% não alterou a morfologia do músculo gastrocnêmio.

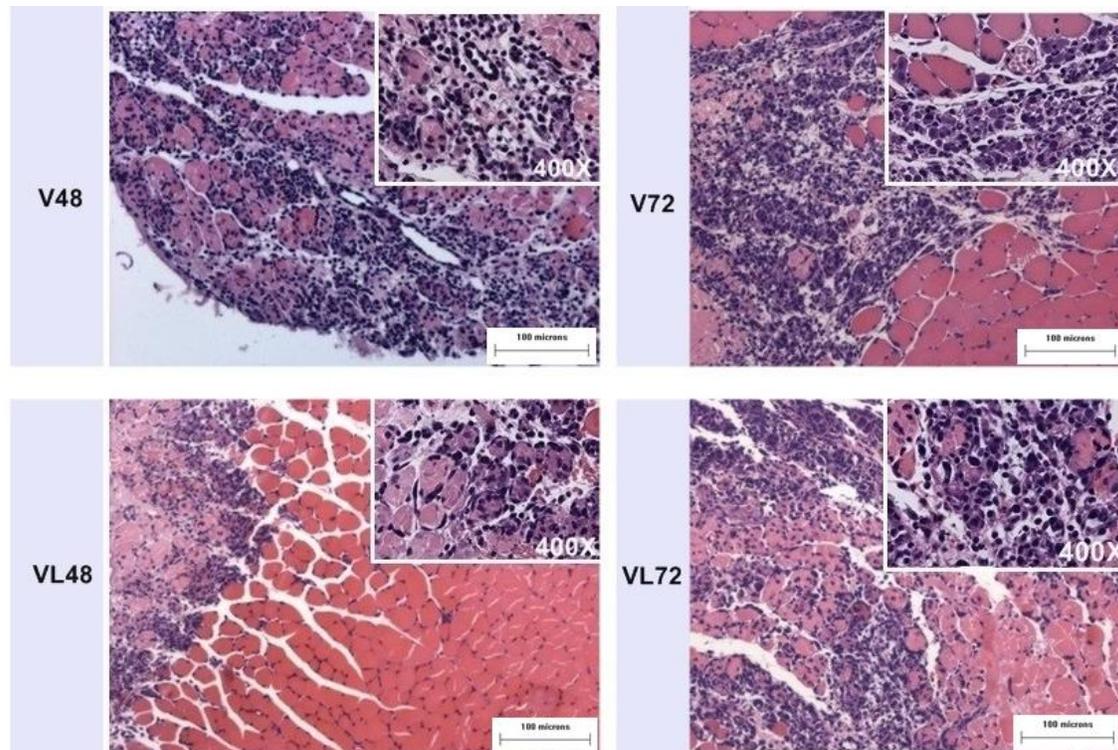


FIGURA 36 – Cortes transversos corados por H&E referentes aos grupos que receberam injeção de *Bjssu*, com ampliação de 100 e 400X (detalhe). Pode ser observada extensa presença de infiltrado inflamatório e fibras musculares degeneradas em todos os grupos. Os grupos VLP48 e VLP72 apresentaram comportamento semelhante aos demais grupos V.

A morfometria da área mionecrótica refere-se apenas aos grupos **V48**, **V72**, **VL48**, **VL72**, **VLP48** e **VLP72**. Os grupos **S** foram desconsiderados por não demonstrarem área de infiltrado inflamatório na análise morfológica, apresentando percentual de área mionecrótica considerada = 0%.

A TABELA 6 a seguir, apresenta os valores médios da área lesionada (em mm²) e o respectivo percentual de mionecrose em relação à área total do corte histológico.

TABELA 6 – Morfometria: cortes histológicos e área mionecrótica.

Grupo	Média ± DP da área total do corte histológico (mm ²)	Área mionecrótica ± DP (mm ²)	% de mionecrose em relação ao corte total ± DP
V48	21,51 ± 5,38	3,48 ± 0,31	17,08 ± 2,91
V72	15,65 ± 0,48	1,23 ± 0,09	7,90 ± 0,05
VL48	24,75 ± 4,16	2,28 ± 0,55	9,18 ± 0,50
VL72	16,71 ± 1,31	0,24 ± 0,20	1,4 ± 0,99
VLP48	11,27 ± 0,37	2,69 ± 0,020	23,97 ± 0,78
VLP72	12,82 ± 0,32	1,10 ± 0,34	8,63 ± 0,84

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos **V48 vs V72** ($17,09 \pm 3,17$ X $7,9 \pm 0,31$), **V48 vs VL48** ($17,09 \pm 3,17$ X $9,18 \pm 0,37$), **V72 vs VL72** ($7,9 \pm 0,31$ X $1,4 \pm 0,7$), assim como na comparação dos grupos tratados com os respectivos grupos placebo: **VL48 vs VLP48** ($9,18 \pm 0,37$ X $23,98 \pm 0,58$), **VL72 vs VLP72** ($1,4 \pm 0,7$ X $8,64 \pm 1,51$). As diferenças entre os grupos podem ser visualizadas no GRÁFICO 46:

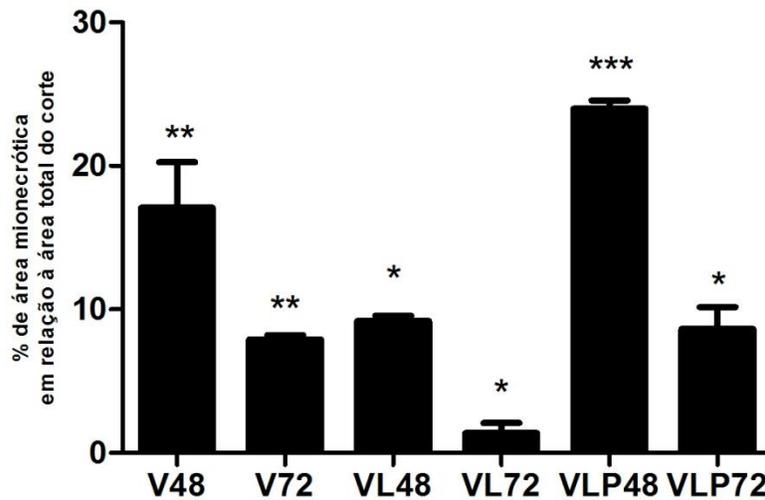


GRÁFICO 46 – Percentual da área mionecrótica em relação à área total do corte histológico.

5.4 Espectroscopia Raman

Previamente à leitura dos espectros referentes ao tecido muscular nos diferentes grupos experimentais, foi realizada a espectroscopia de *Bjssu* liofilizado bruto e liofilizado e diluído em *NaCl* 0,9%, este último nas mesmas condições em que o veneno é injetado no músculo gastrocnêmio. Os espectros obtidos podem ser visualizados na FIGURA 37, abaixo:

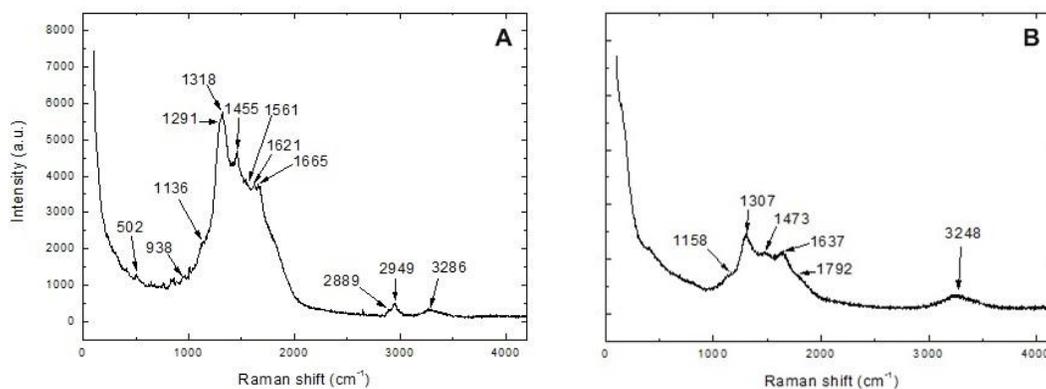


FIGURA 37 – Espectros de *Bjssu* liofilizado bruto (A) e liofilizado e diluído em *NaCl* 0,9% (B).

Os picos de *Bjssu* na condição **A** representam, na ordem em que foram plotados: torção C-OH₃ do grupo metoxi; prolina, hidroxiprolina, ν (C-C) – colágeno *backbone*; alongamento C-C *backbone*; regiões próximas do ácido graxo, ácido palmítico e carboidratos; citosina; guanina (bases de DNA/RNA) e amida III; desoxirribose e δ (CH₂); triptofano e COO⁻; espectros em região sensível a interações de pares de bases e efeitos *base-stacking* (formação de hidrogênio); amida I (relacionada ao colágeno).

Para a condição **B** de *Bjssu*, todos os picos sofreram alterações, sendo: alongamento C-C/C-N (proteínas); *twisting/bending/wagging mode* CH₃CH₂ – lipídio e colágeno; parafina (carbono e hidrogênio); banda amida I (α -hélice e β -estrutura).

As análises de espectroscopia Raman demonstraram regularidade quanto à região do espectro em que os picos ocorreram, variando de 875 cm⁻¹ até 1671 cm⁻¹ (entre outras regiões de menor intensidade). Os espectros médios podem ser observados na FIGURA 38:

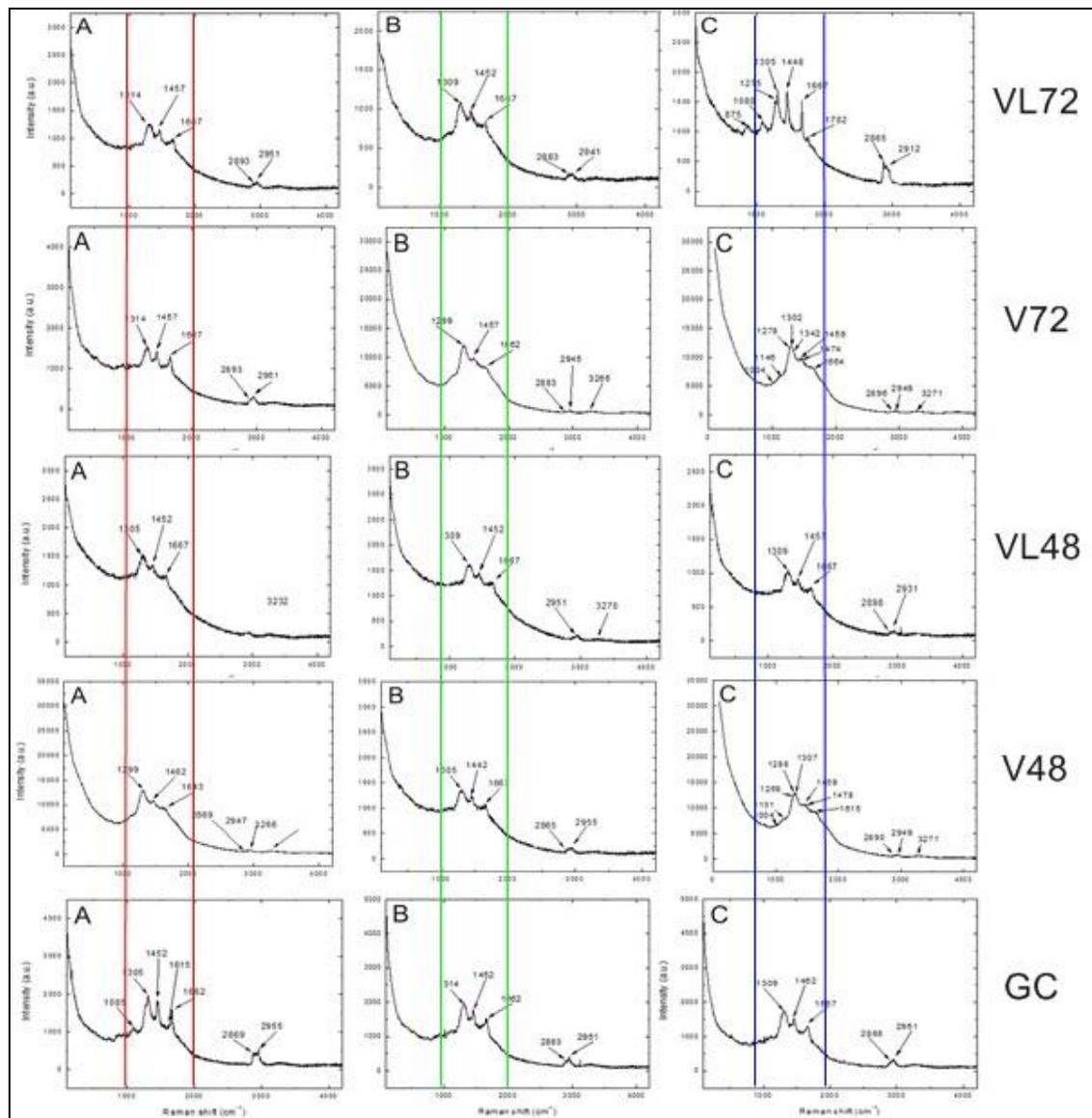


FIGURA 38 – Espectros médios de espalhamento Raman dos diferentes grupos.

Foram observadas diferenças na comparação entre todos os grupos avaliados (GC, V48, V72, VL48 e VL72), sendo que a análise qualitativa intra-grupo demonstrou regularidade entre os valores espectrais das três amostras. Os músculos controle (GC) apresentaram picos regulares observados na FIGURA 39 e descritos na TABELA 7:

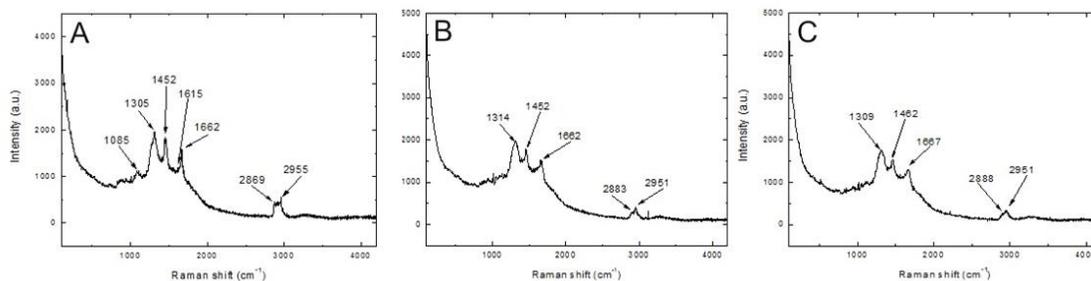


FIGURA 39 – Picos de espalhamento Raman do grupo controle (GC), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 7 – Número de onda e descrição aproximada do espalhamento Raman do grupo controle (GC), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2007.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições aproximadas
1085 cm ⁻¹	Grupos fosfodiéster em ácidos nucleicos
1305 cm ⁻¹	deformação de componentes CH ₂ – lipídeos – adenina e citosina
1309 cm ⁻¹	<i>twisting/bending mode</i> CH ₃ CH ₂ – lipídio e colágeno
1312 cm ⁻¹	ligações CH ₃ CH ₂ referentes ao colágeno e lipídeos (<i>twisting mode</i>)
1314 cm ⁻¹	<i>twisting mode</i> CH ₃ CH ₂ – colágeno
1452 cm ⁻¹	deformação CH ₂ CH ₃ atribuído ao colágeno e bandas proteicas
1455 cm ⁻¹	desoxirribose e δ(CH ₂)
1462 cm ⁻¹	δ(CH ₂), dissacarídeos e sacarose
1615 cm ⁻¹	tirosina, triptofano e C=C (proteína)
1662 cm ⁻¹	teor significativo de ácidos nucleicos no tecido
1667 cm ⁻¹	banda proteica, estrutura α-helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral.
1671 cm ⁻¹	amida I, ligações C=C, colesterol e seus ésteres

Os picos referentes ao grupo V48 podem ser visualizados na FIGURA 40. As alterações relacionadas (principalmente) aos picos encontram-se descritos na TABELA 8:

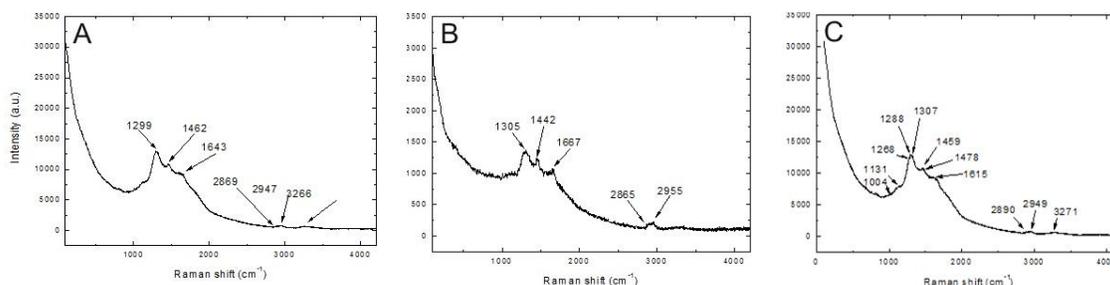


FIGURA 40 – Picos de espalhamento Raman do grupo V48, referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 8 – Número de onda e descrição aproximada do espalhamento Raman do grupo veneno 48h (V48), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2007.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições aproximadas
1004 cm ⁻¹	fenilalanina (colágeno)
1131 cm ⁻¹	ácido palmítico e ácido graxo
1268 cm ⁻¹	δ (=C-H) (fosfolípidios)
1299 cm ⁻¹	deformação CH ₂ – lipídica
1305 cm ⁻¹	deformação CH ₂ (lipídio), adenina, citosina
1307 cm ⁻¹	CH ₃ /CH ₂ <i>twisting/bending/wagging mode</i> de lipídeos e Colágeno
1442 cm ⁻¹	ácidos graxos; CH ₂ <i>bending mode</i> alterações químicas em CH ₂ <i>bending mode</i> deformação CH ₃ , CH ₂ (colágeno) triglicérides (ácidos graxos)
1459 cm ⁻¹	desoxirribose e δ(CH ₂)
1462 cm ⁻¹	δ(CH ₂), dissacarídeos e sucrose
1478 cm ⁻¹	região próxima a Amida II
1615 cm ⁻¹	tirosina, triptofano, C=C (proteína)
1643 cm ⁻¹	banda proteica Amida I; α-hélice Amida I.

1667 cm^{-1} banda proteica , estrutura α -helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral.

Os picos referentes ao grupo V72 podem ser visualizados na FIGURA 41 e as descrições aproximadas na TABELA 9:

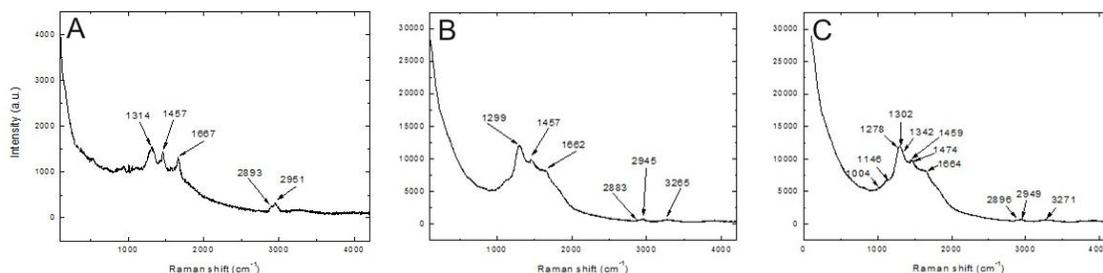


FIGURA 41 – Picos de espalhamento Raman do grupo V72, referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 9 – Número de onda e descrição aproximada do espalhamento Raman do grupo veneno 72h (V72), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2007.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições aproximadas
1004 cm^{-1}	fenilalanina (colágeno)
1146 cm^{-1}	carboidratos
1278 cm^{-1}	proteínas, incluindo colágeno
1299 cm^{-1}	deformação CH_2 – lipídica
1302 cm^{-1}	$\delta(\text{CH}_2)$ twisting/wagging – colágeno, fosfolipídios <i>twisting/bending mode</i> CH_3CH_2 – colágeno, lipídeos amida III (proteína) metileno (combinação de lipídeos e proteínas)
1314 cm^{-1}	<i>twisting mode</i> CH_3CH_2 – colágeno
1342 cm^{-1}	G (DNA/RNA) deformação CH (proteínas e carboidratos)
1457 cm^{-1}	desoxirribose

1459 cm^{-1}	desoxirribose e $\delta(\text{CH}_2)$
1474 cm^{-1}	alongamento C=N, parafina, Amida II
1662 cm^{-1}	teor significativo de ácidos nucleicos no tecido
1664 cm^{-1}	amida I
1667 cm^{-1}	banda proteica, estrutura α -helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral.

Com relação aos grupos tratados com laser, os mesmos apresentaram regularidade entre as três amostras submetidas à técnica de espectroscopia Raman. Os picos referentes ao grupo VL48 podem ser visualizados na FIGURA 42, juntamente com a descrição aproximada (TABELA 10):

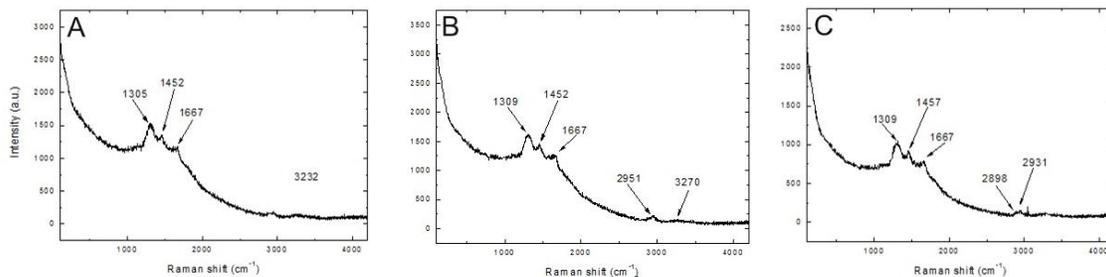


FIGURA 42 – Picos de espalhamento Raman do grupo VL48, referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 10 – Número de onda e descrição aproximada do espalhamento Raman do grupo veneno + laser 48h (VL48), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2007.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições aproximadas
1305 cm ⁻¹	Deformação de componentes CH ₂ – lipídeos – adenina e citosina
1309 cm ⁻¹	<i>twisting/bending mode</i> CH ₃ CH ₂ – lipídio e colágeno
1452 cm ⁻¹	deformação CH ₂ CH ₃ atribuído ao colágeno e bandas proteicas
1457 cm ⁻¹	Desoxirribose
1667 cm ⁻¹	banda proteica, estrutura α-helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral.

Os picos referentes ao grupo VL72 podem ser visualizados na FIGURA 43 e encontram-se descritos na TABELA 11:

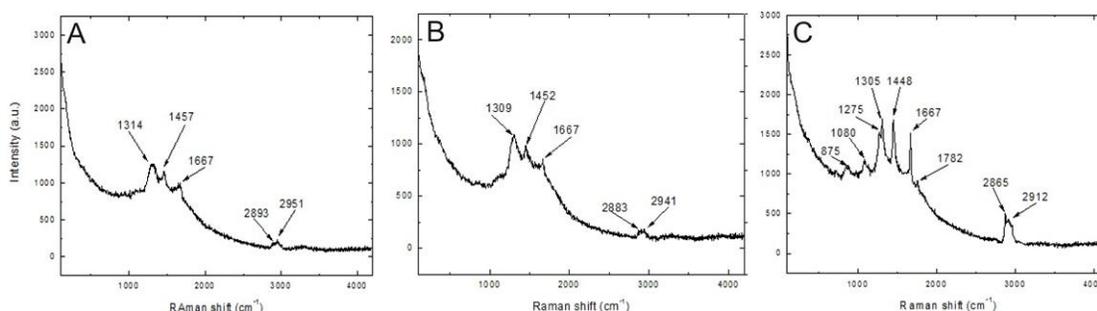


FIGURA 43 – Picos de espalhamento Raman do grupo VL72, referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 11 - Número de onda e descrição aproximada do espalhamento Raman do grupo veneno + laser 72h (VL72), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2007.

Nº de Onda (cm⁻¹)	Atribuições aproximadas
875 cm ⁻¹	Deformação de componentes CH ₂ – lipídeos – adenina e citosina
1080 cm ⁻¹	<i>twisting/bending mode</i> CH ₃ CH ₂ – lipídeos e colágeno
1275 cm ⁻¹	deformação CH ₂ CH ₃ atribuído ao colágeno e bandas proteicas
1305 cm ⁻¹	Desoxirribose
1309 cm ⁻¹	banda proteica, estrutura α-helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral
1314 cm ⁻¹	<i>twisting mode</i> CH ₃ CH ₂ – colágeno
1448 cm ⁻¹	deformações CH ₃ CH ₂ , CH ₂ e colágeno
1452 cm ⁻¹	deformação CH ₂ CH ₃ atribuído ao colágeno e bandas proteicas
1457 cm ⁻¹	desoxirribose
1667 cm ⁻¹	banda proteica, estrutura α-helicoidal amida I e presença de proteínas estruturais que podem estar relacionadas à formação tumoral

5.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A partir dos espectros obtidos pela análise de FT-IR verificou-se regularidade quanto à região espectral em que os picos ocorreram, variando de 500 cm^{-1} até 1747 cm^{-1} (entre outras regiões de menor intensidade). Os espectros médios dos períodos de 48 e 72h comparados ao GC podem ser observados nas FIGURAS 44 e 45:

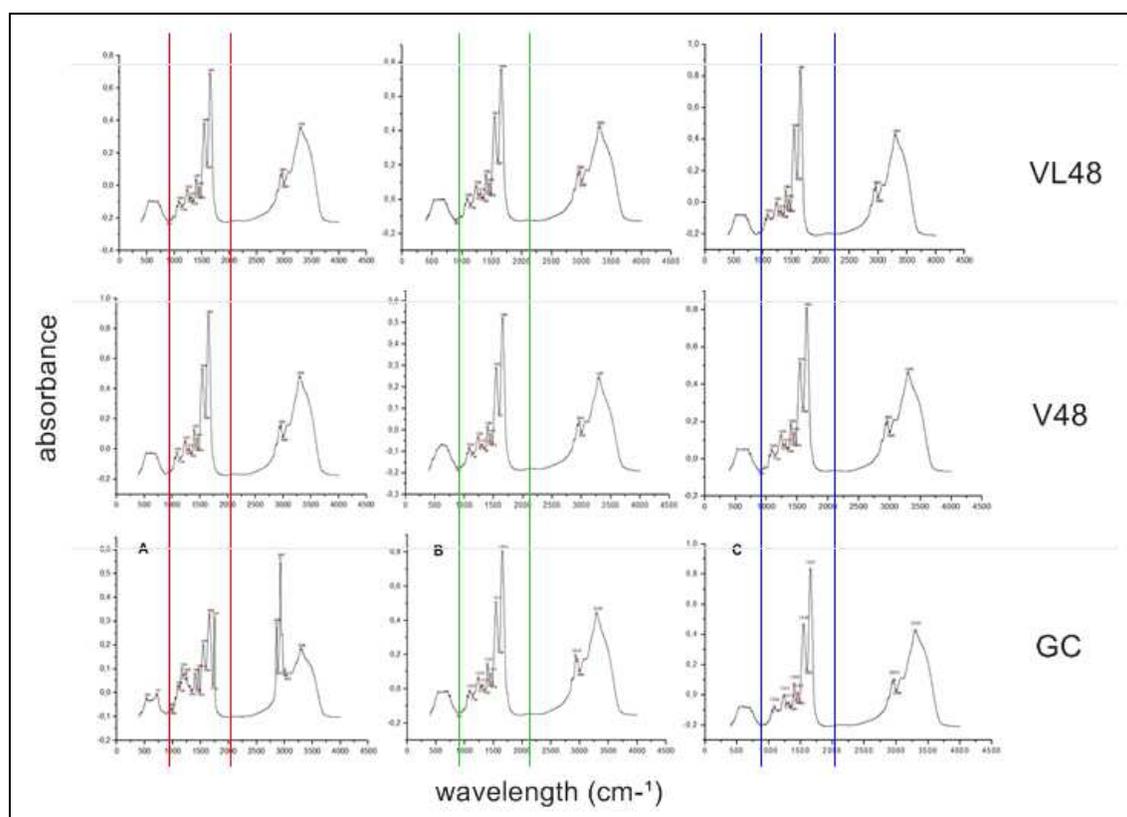


FIGURA 44 – Espectros médios de FT-IR dos grupos 48h em relação ao GC.

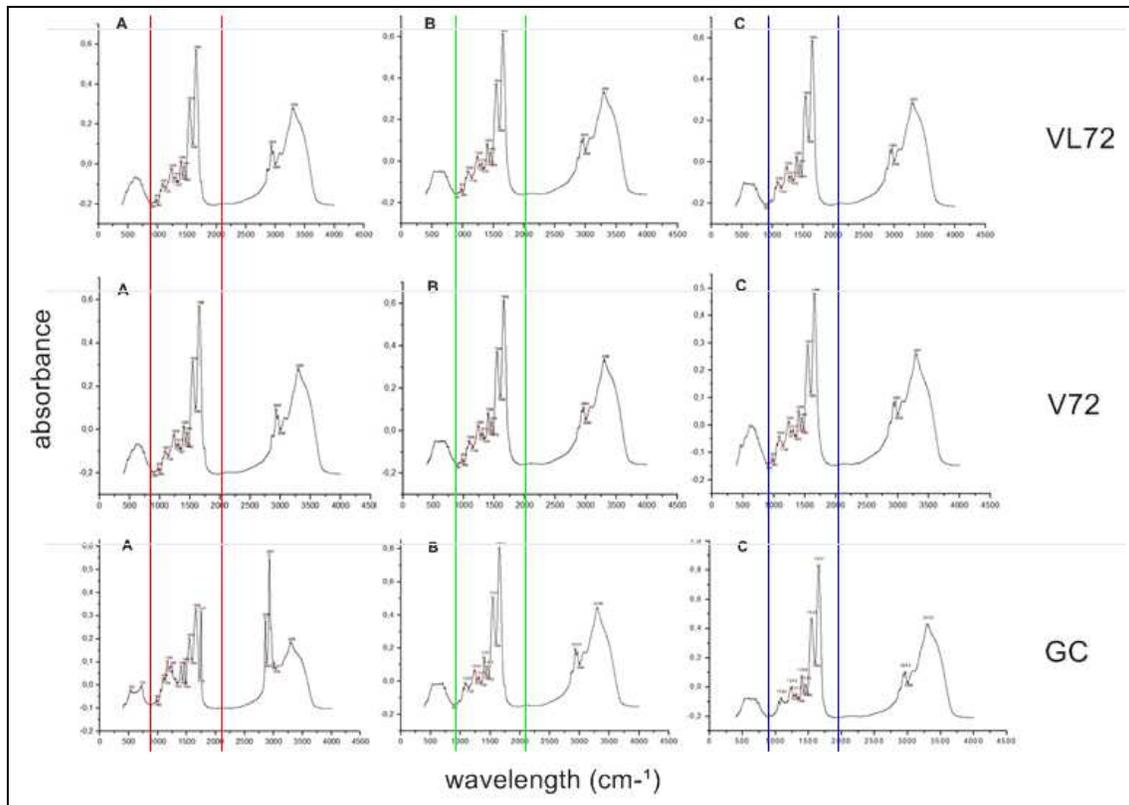


FIGURA 45 – Espectros médios de FT-IR dos grupos 72h em relação ao GC.

Com os espectros obtidos (FIGURAS 46-50) foi possível realizar as atribuições de bandas aproximadas para os grupos GC, V48, VL48, V72 e VL72, descritas nas TABELAS 12-16:

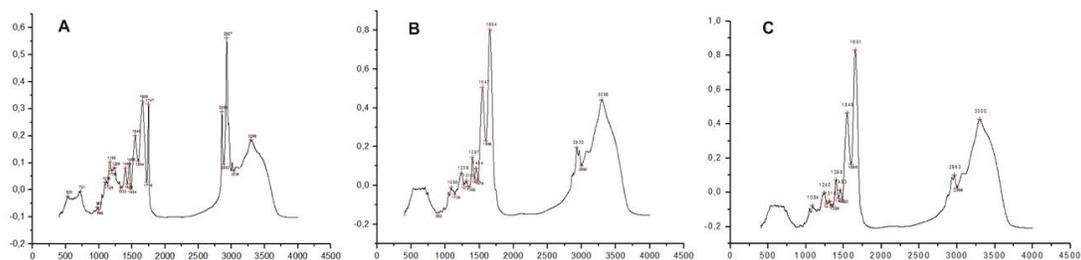


FIGURA 46 – Espectros infravermelhos do grupo controle (GC), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 12 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros do grupo controle (GC), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2008.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições aproximadas
510 cm^{-1}	torção do anel fenil
721 cm^{-1}	vibrações em flexão (out-of-plane)
982 cm^{-1}	OCH ₃ – polissacarídeos-celulose
1085 cm^{-1}	fosfato II (PO ₂ simétrico)
1096 cm^{-1}	alongamento simétrico PO ₂
1168 cm^{-1}	alongamento C-O, C-OH (serina, treonina e tirosina)
1192 cm^{-1}	desoxirribose / colágeno
1239 cm^{-1}	alongamento assimétrico PO ₂ ; colágeno
1310 cm^{-1}	amida III
1400 cm^{-1}	alongamento simétrico – vibração de COO ⁻ , ácidos graxos e aminoácidos; δ_s CH ₃ de proteínas; modo de flexão simétrica de grupos metil em proteínas; absorção específica de proteínas.
1454 cm^{-1}	deformação assimétrica do grupo metil
1466 cm^{-1}	CH ₂ - modo <i>scissoring</i> da cadeia acil de lipídeos; banda colesterol-metil
1549 cm^{-1}	amida II
1651 cm^{-1}	amida I; C=O; alongamento C=C uracil; guanina NH ₂
1658 cm^{-1}	C=O; alongamento C=C uracil; guanina NH ₂ ; Amida I
1747 cm^{-1}	grupo éster (C=O), vibração de triglicerídeos

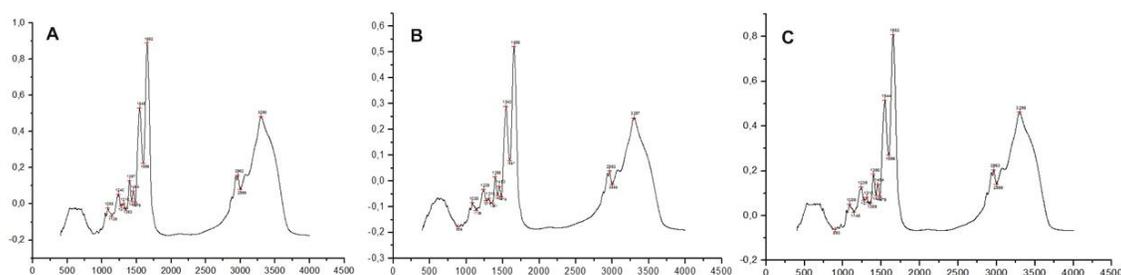


FIGURA 47 – Espectros infravermelhos do grupo veneno 48h (V48), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 13 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros do grupo veneno 48h (V48), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2008.

Nº de Onda (cm ⁻¹)	Atribuições aproximadas
1085 cm ⁻¹	fosfato II (PO ₂ simétrico)
1240 cm ⁻¹	alongamento assimétrico PO ₂ ; colágeno
1310 cm ⁻¹	amida III
1397 cm ⁻¹	picos de DNA e RNA; deformação simétrica CH ₃ ; modo vibracional de grupos metil e metileno de proteínas e lipídios e grupos amida; modo de flexão simétrica CH ₃ de grupos metil de proteínas; δ[(CH ₃)] simétrico; δ[C(CH ₃) ₂] simétrico
1454 cm ⁻¹	deformação assimétrica do grupo metil
1545 cm ⁻¹	amida II
1652 cm ⁻¹	amida I; C=O; alongamento C=C uracil; guanina NH ₂

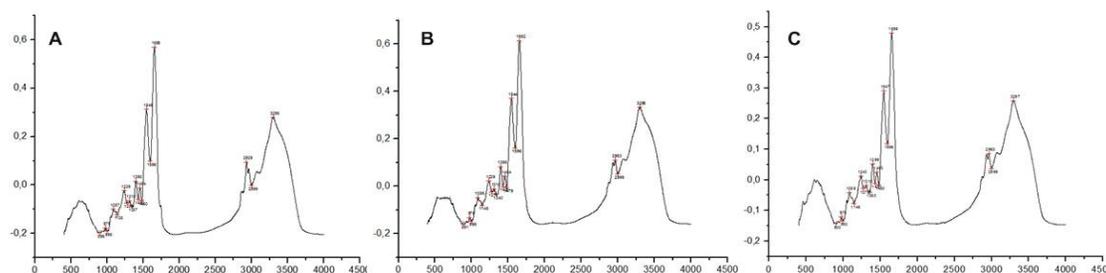


FIGURA 48 – Espectros infravermelhos do grupo veneno 72h (V72), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 14 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros do grupo veneno 72h (V72), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2008.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições aproximadas
975 cm^{-1}	OCH ₃ – polissacarídeos; pectina
1085 cm^{-1}	fosfato II (PO ₂ simétrico)
1239 cm^{-1}	alongamento assimétrico PO ₂ ; colágeno
1310 cm^{-1}	amida III
1399 cm^{-1}	picos de DNA e RNA; deformação simétrica CH ₃ ; modo vibracional de grupos metil e metileno de proteínas e lipídios e grupos amida; modo de flexão simétrica CH ₃ de grupos metil de proteínas; δ [(CH ₃)] simétrico; δ [C(CH ₃) ₂] simétrico
1454 cm^{-1}	deformação assimétrica do grupo metil
1545 cm^{-1}	amida II
1655 cm^{-1}	amida I (de proteínas em conformação α -hélice); amida I (ν C=O, δ C-N, δ N-H); C=O (citosina); C=O, C=N, N-H de adenina, timina, guanina e citosina; pico de ácidos nucleicos – alongamento de base carbonila

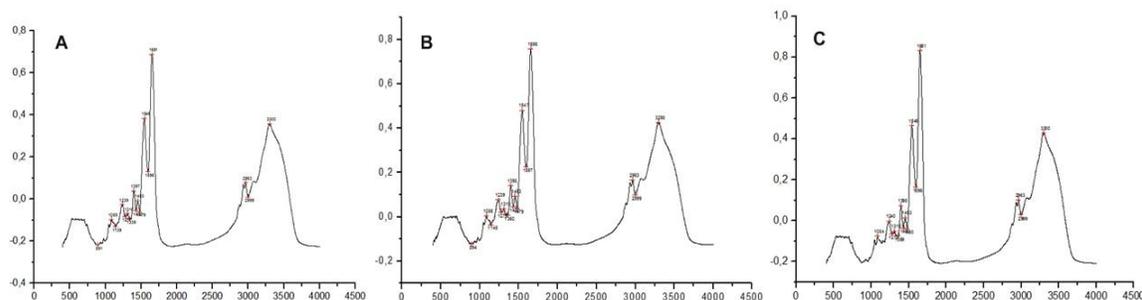


FIGURA 49 – Espectros infravermelhos do grupo veneno + laser 48h (VL48), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 15 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros do grupo veneno + laser 48h (VL48), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2008.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições aproximadas
1085 cm^{-1}	fosfato II (PO_2 simétrico)
1239 cm^{-1}	alongamento assimétrico PO_2 ; colágeno
1310 cm^{-1}	amida III
1398 cm^{-1}	deformação simétrica CH_3
1453 cm^{-1}	deformação assimétrica do grupo metil
1546 cm^{-1}	amida II, banda proteica
1651 cm^{-1}	amida I; $\text{C}=\text{O}$; alongamento $\text{C}=\text{C}$ uracil; guanina NH_2

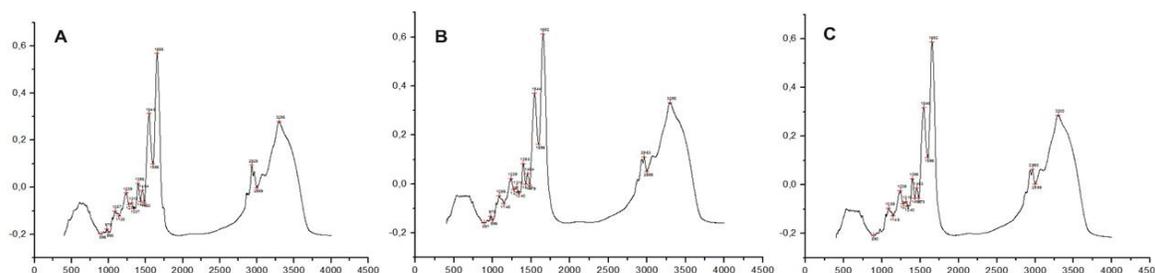


FIGURA 50 – Espectros infravermelhos do grupo veneno + laser 72h (VL72), referentes às amostras I (a), II (b) e III (c).

TABELA 16 - Número de onda e descrição aproximada dos espectros do grupo veneno + laser 72h (VL72), de acordo com Movasaghi, Rehman e Rehman, 2008.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições aproximadas
975 cm^{-1}	OCH_3 – polissacarídeos; pectina
1085 cm^{-1}	fosfato II (PO_2 simétrico)
1239 cm^{-1}	alongamento assimétrico PO_2 ; colágeno
1310 cm^{-1}	amida III
1398 cm^{-1}	deformação simétrica CH_3
1454 cm^{-1}	deformação assimétrica do grupo metil
1546 cm^{-1}	amida II, banda proteica
1652 cm^{-1}	amida I; $\text{C}=\text{O}$; alongamento $\text{C}=\text{C}$ uracil; guanina NH_2

Foram realizados os cálculos de intensidade relativa (a) e área relativa (b) entre as bandas em 1657 e 1547 cm^{-1} . Os dois métodos indicam que nas amostras que receberam o tratamento com laser houve maior aumento da intensidade de Amida I, conforme pode ser visualizado nos GRÁFICOS 47 e 48:

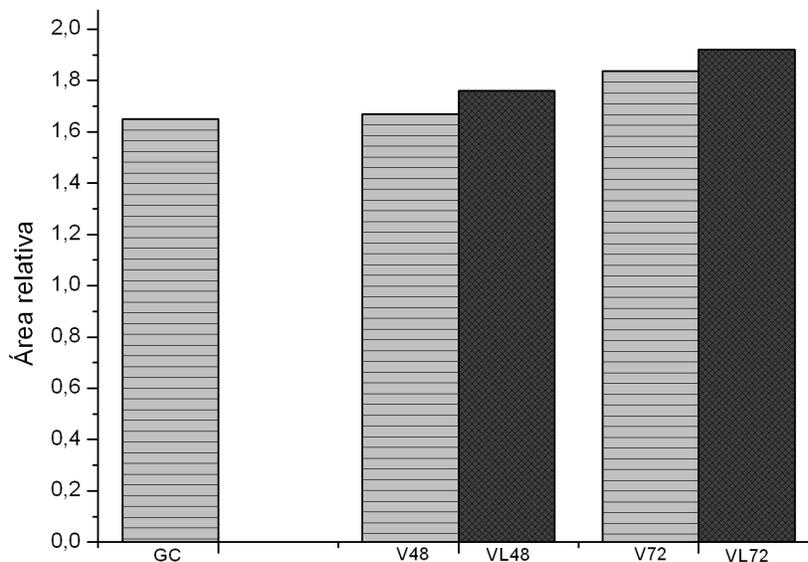


GRÁFICO 47 – Área relativa entre as bandas 1657 e 1547 cm^{-1} dos grupos GC, V48, VL48, V72 e VL72.

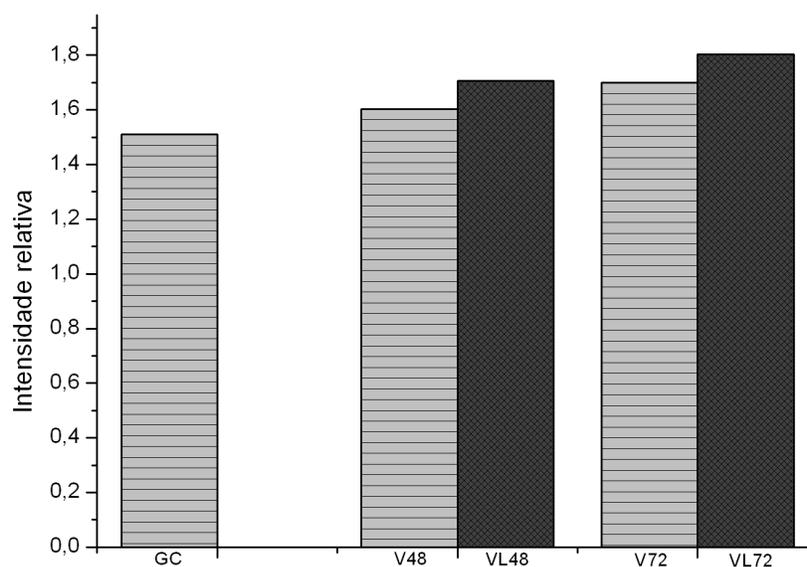


GRÁFICO 48 – Intensidade relativa entre as bandas 1657 e 1547 cm⁻¹ dos grupos GC, V48, VL48, V72 e VL72.

6 - DISCUSSÃO

LLLT e mionecrose induzida por veneno de serpentes

Como esperado, a mionecrose induzida pela injeção de *Bjssu* promoveu alteração da função motora dos animais no momento mais precoce da análise (3h pós-lesão). A área mionecrótica foi maior nos grupos V48 e VLP48, sendo 17,08% e 23%, respectivamente. A extensão da lesão pôde ser visualizada nos cortes histológicos, com extensa presença de células relacionadas à resposta inflamatória.

A LLLT tem acelerado o processo de reparo do tecido mionecrótico, como demonstrado por Dourado e colaboradores (2003), que utilizaram veneno de serpente *Bothrops moojeni* (0,4mg/kg) como agente causador da mionecrose no músculo gastrocnêmio de ratos e realizaram irradiação com laser GaAs (904nm) e densidade de energia de 4J/cm² (mesmos parâmetros utilizados em nosso estudo). Os resultados mostraram que no grupo sem tratamento houve maior hemorragia, congestão vascular, progressão da mionecrose, abundante infiltrado inflamatório e altos níveis séricos de CK. Já nos grupos tratados houve redução significativa da mionecrose em todos os períodos avaliados.

A indagação pertinente seria de que o laser possua efeito protetor sobre as células expostas às miotoxinas, uma vez que, na análise histológica tanto nos grupos veneno (V48 e V72) quanto nos grupos tratados (VL48 e VL72) a presença de extenso infiltrado celular é semelhante, no entanto, nos grupos tratados a mionecrose fica restrita a uma área menor.

A respeito do possível efeito protetor da LLLT contra a miotoxicidade, Doin-Silva e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos do laser HeNe (632,8nm, doses de 3,5 e 10,5J/cm²) sobre o músculo tibial anterior de ratos submetidos à lesão por *Bjssu*. Os autores observaram que os animais irradiados com a dose de 3,5J/cm² apresentaram um menor bloqueio neuromuscular, menor área mionecrótica e menores níveis de CK. Foi sugerido que a irradiação com laser favoreceu a condução nervosa dos nervos poplíteo e isquiático por facilitar a liberação de ACh nas terminações nervosas e diminuir o nível de despolarização das membranas, caracterizando assim um efeito protetor contra a neurotoxicidade do *Bjssu*.

Em um estudo similar, porém fazendo uso da miotoxina ACL (Lys49 tipo II, fosfolipase A₂), Amaral, Parizotto e Salvini (2001) avaliaram o efeito do laser HeNe (632,8 nm; 2,6 mW; 0,007 cm²) na mionecrose do músculo tibial anterior, observando que para a dose de 2,6 J/cm² (comparada a doses maiores) houve aumento da densidade mitocondrial e das fibras musculares no período de 5 dias após injeção de ACL e tratamentos diários com LLLT.

Este mesmo grupo de pesquisadores afirmou que, ao comparar o protocolo experimental, substituindo apenas o laser HeNe (632,8 nm) por GaAs (904 nm), o primeiro tipo de laser demonstrou maior eficiência na regeneração do músculo tibial anterior de camundongos ao utilizar baixas doses de energia (OLIVEIRA; PARIZOTTO; SALVINI, 1999).

O parâmetro mais importante que determina a profundidade da penetração da luz nos tecidos é o comprimento de onda do feixe. Quanto mais próximo ao infravermelho, maior a penetração nos tecidos. Há evidências de que os

comprimentos de onda pulsados consigam atingir tecidos mais profundos, quando comparados à emissão contínua. Quando são utilizados comprimentos de onda de aproximadamente 810nm, estima-se que a intensidade do laser é reduzida em torno de 10% a cada centímetro de tecido irradiado (HASHMI *et al.*, 2010).

Em nosso estudo optamos pelo laser GaAs (904 nm) por tratar-se de um modelo de mionecrose induzida no interior do músculo gastrocnêmio, o qual encontra-se abaixo de camadas de pele, fáscia e outros tecidos adjacentes, como adiposo, por exemplo.

De acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, o tratamento indicado para os casos de envenenamento por acidente botrópico consiste no uso do soro antibotrópico (SAB) ou antibotrópico-laquétrico (SABL), em volume correspondente à gravidade do evento. A respeito dessa informação, Barbosa e colaboradores (2008) investigaram os efeitos do laser GaAs (685nm; 29mW, 29 s; 0,2cm²; 4,2J/cm²) associado ou não ao SAB. O grupo de ratos expostos isoladamente à LLLT apresentou redução significativa do edema, diferentemente do uso exclusivo do SAB, que não foi efetivo quanto à esse sinal. Já o tratamento combinado de LLLT e SAB demonstrou ser altamente eficaz na redução do edema, do infiltrado leucocitário e de células polimorfonucleares.

Assim como o uso do SAB, Vomero, Marques e Santo-Neto (2009) administraram anti-inflamatório (deflazacort) a ratos submetidos à mionecrose do m. tibial anterior por *Bjssu*. Observaram que no grupo tratado com esse medicamento, cerca de 50% da área total do músculo foi invadida por tecido fibrótico, representando 22% a mais que no grupo não tratado. De acordo com os

autores, a fibrose pode contribuir para a redução do número de fibras musculares regeneradas (em até 41%) e da população de células satélites, sugerindo que a administração do anti-inflamatório, apesar de reduzir a densidade de células inflamatórias, pode levar a uma perda de massa muscular mais acentuada. Isso justifica a busca de outros tipos de intervenção (não medicamentosas) na tentativa de reduzir as sequelas causadas por acidentes botrópicos.

Caracterização por espectroscopia vibracional

De acordo com dados do Ministério da Saúde, os acidentes ofídicos caracterizados como o envenenamento causado por inoculação de toxinas por meio das presas de serpentes, e que podem determinar alterações locais e/ou sistêmicas, são considerados de interesse em saúde. Acidentes por serpentes não peçonhentas são relativamente frequentes, porém não determinam acidentes graves e possuem menor importância médica.

Na maioria dos casos, o tipo de envenenamento é identificado com base no reconhecimento das manifestações clínicas e na história epidemiológica. O diagnóstico por meio da identificação do animal é pouco frequente. Isso nos levou a pensar em novas formas de identificar características próprias do veneno botrópico, bem como sua presença nos tecidos. O uso da espectroscopia Raman e do FT-IR caracterizaram a primeira tentativa de empregar a bioespectroscopia neste modelo experimental.

A espectroscopia no infravermelho tem provado ser uma poderosa ferramenta no estudo de moléculas biológicas e a aplicação desta técnica nesse

tipo de abordagem está continuamente se expandindo. Os sistemas biológicos – incluindo lipídeos, proteínas, peptídeos, biomembranas, ácidos nucleicos, tecidos animal, células microbianas e amostras clínicas – têm sido muito amplamente estudados por meio do uso da espectroscopia (STUART *et al.*, 2004).

Quando absorvida por uma molécula orgânica, a radiação infravermelha converte-se em energia de vibração molecular. Dessa forma o espectro reflete o movimento vibracional e aparece em forma de bandas. A possibilidade de compostos diferentes possuírem o mesmo espectro no infravermelho é pouco provável. É por conta disso que cada função orgânica apresenta no espectro a região de impressão digital na faixa de 900 a 1300 cm^{-1} (SOLOMON *et al.*, 2005).

As aplicações da espectroscopia Raman em materiais biológicos somente foram estabelecidas após a introdução da espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) no final da década de 1980 (LAWSON *et al.*, 1997). Recentemente, houve um aumento significativo na aplicação da espectroscopia Raman no campo da medicina, partindo do princípio de que a presença de doenças leva a mudanças na composição molecular dos tecidos afetados, mudanças essas que podem ser traduzidas em espectros (CHOO-SMITH *et al.*, 2002).

Um grande número de pesquisadores tem relatado as aplicações da espectroscopia Raman em tecidos biológicos, o que inclui a investigação de alterações em diversos tipos de tecido como osso, córnea, epitélio, cérebro, tecido gastrointestinal, placa aterosclerótica, artéria coronária, câncer, DNA e diversos

tipos de células, incluindo cultura celular (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

Grande ênfase tem sido dada à aplicação da espectroscopia Raman na detecção de tecidos neoplásicos. Esta técnica pode ser empregada na tentativa de complementar o diagnóstico baseado no exame histopatológico das amostras obtidas por meio de biópsia do tecido afetado. A análise das anormalidades morfológicas, por si só, depende da experiência do examinador (patologista), demanda tempo entre a investigação, o diagnóstico e o início do tratamento, aumentando assim os riscos, a ansiedade do paciente e os custos financeiros envolvidos em todo o processo (STONE *et al.*, 2003).

Em nosso estudo não estamos tratando de tecido neoplásico, mas podemos estabelecer uma relação segura com algumas questões que envolvem os acidentes botrópicos. Nestes casos, há extrema necessidade de diagnóstico precoce para estabelecer o antiveneno a ser utilizado, bem como para amenizar a dor do paciente e reduzir a incidência de sequelas. Uma grande contribuição seria identificar, em fração de minutos, o tipo de serpente que causou o acidente, baseado na “identidade molecular” do veneno traduzida em espectros.

A grande dificuldade que encontramos no estudo da espectroscopia Raman em tecido muscular submetido à mionecrose foi a lacuna existente na literatura sobre aplicações deste tipo de técnica na caracterização de modelos similares ao nosso. Mesmo na extensa revisão de Movasaghi, Rehman e Rehman (2007), na qual baseamos os nossos resultados, não encontramos relatos de estudos que envolveram diretamente o músculo esquelético.

Atualmente é possível que as técnicas de espectroscopia vibracional sejam realizadas sobre tecidos biológicos utilizando fibra óptica, o que exclui a necessidade de biópsia do tecido, permitindo a análise *in vivo*, em tempo real. No entanto, este tipo de análise poderia gerar uma maior quantidade de ruídos, mascarando nossos resultados, uma vez que não temos referências específicas do comportamento do espalhamento Raman nesse modelo experimental de estudo.

No músculo a relação sinal/ruído do sinal é modificada, ou seja, ocorre um aumento significativo de ruído e diminuição do sinal da substância estudada, o que pode dificultar a detecção fisiológica do *Bjssu*. Este, ao ser diluído em *NaCl 0,9%*, apresenta redução da intensidade do sinal comparado ao traçado de *Bjssu* liofilizado bruto.

As dificuldades encontradas no uso da espectroscopia Raman quanto à relação sinal/ruído foram descritas por Pilotto e colaboradores (2001), em estudo envolvendo a detecção de ácido láctico por meio de fibra óptica. Os autores observaram que a intensidade de ruído causada pelo forte sinal Raman emitido pela fibra óptica interferiu diretamente no sinal do ácido láctico. Nestes casos, a opção é utilizar o sistema convencional, ou seja, Raman de bancada.

Ao ser injetado no músculo, os picos mais intensos do veneno nas duas condições previamente avaliadas (bruto e diluído) não foram mais visualizados, com exceção para o pico 1307 cm^{-1} , o qual ocorreu no grupo V48. Acreditamos que o metabolismo muscular e as alterações bioquímicas e estruturais causadas pelo veneno não permitiram a identificação mais ampla do *Bjssu* no período mais

tardio da análise (V72). Do mesmo modo, o laser pode ter alterado a ação mionecrótica do veneno nos grupos tratados. Com isso, cabe verificar se o *Bjssu* exposto ao laser tem suas propriedades químicas alteradas, como sugestão para trabalhos futuros.

A partir da análise do grupo controle (GC), acreditamos que as alterações observadas nos espectros do tecido muscular submetido à injeção de *Bjssu* estejam relacionadas à ação deste veneno. Quando relacionamos a mionecrose com o tecido submetido à LLLT observamos grandes diferenças espectrais que nos fazem pensar que o laser também possa agir sobre a área mionecrótica, no sentido de alterar as propriedades químicas do veneno.

A região 1667 cm^{-1} foi observada em todos os grupos avaliados. Ela é citada no trabalho de Utzinger e colaboradores (2001) como característica tanto de tecidos normais quanto de tecidos com formação tumoral. O mesmo comportamento serve para o pico 1452 cm^{-1} , sendo que no caso do tecido biológico normal, o fator dominante da região espectral é a presença de ácidos graxos, enquanto que no tecido tumoral está mais ligado à estrutura proteica. Em nosso estudo, o pico 1452 cm^{-1} foi observado nos grupos GC, VL48 e VL72, caracterizando mais uma diferença entre os grupos *Bjssu* e os tratados com LLLT.

A espectroscopia Raman e a FT-IR são técnicas que se complementam. É possível considerar algumas diferenças entre elas: a FT-IR é mais empregada para amostras não aquosas, diferentemente do Raman, que pode ser utilizado tanto para amostras aquosas ou não aquosas. Este último requer mínima preparação da amostra e pode fornecer imagem do tipo confocal, enquanto o FT-

IR requer relativamente maior preparação das amostras e não necessariamente fornece esse tipo de imagem. O efeito físico do infravermelho é criado pela absorção e influencia o dipolo e as bandas iônicas como O-H, N-H e C=O.

De acordo com Silverstein (2005), para a interpretação de um espectro de infravermelho não existem regras rígidas, devendo-se levar em conta certos requisitos antes de tentar a interpretação, tais como:

- ❖ O espectro deve ter resolução adequada e intensidade razoável;
- ❖ O composto utilizado deve ser razoavelmente puro;
- ❖ O espectrômetro deve ser calibrado contra padrões, de forma que as bandas sejam observadas nas frequências ou comprimentos de onda corretos;
- ❖ O método de manipulação da amostra deve ser especificado, como exemplo se em solução é preciso indicar o solvente, a concentração e o passo óptico da célula utilizada.

Em geral, os espectros são interpretados a partir de comparações empíricas com outros espectros e da extrapolação de resultados obtidos com moléculas mais simples.

A mais importante contribuição da espectroscopia no infravermelho para análise de sistemas biológicos é o estudo de biomoléculas. O colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo. A estrutura secundária do colágeno – alfa-hélice – absorve

aproximadamente no intervalo de 1651 a 1657 cm^{-1} . No espectro infravermelho, observa-se a banda conhecida como amida I que corresponde a 80% do modo vibracional do estiramento da ligação C=O e é utilizada para o estudo de estruturas secundárias de proteína. No espectro em questão, a banda de amida I é a mais intensa e a intensidade ou área desta banda indica alteração nas proteínas.

O cálculo foi realizado comparando a intensidade e a área das bandas de amida I e amida II. A banda de amida II aparece ao lado de amida I em 1547 cm^{-1} (segunda mais intensa). Esta corresponde a 60 % do modo vibracional da deformação angular da ligação N-H e 40% do estiramento da ligação N-H, geralmente utilizada como banda de referência por se alterar pouco com o tratamento. Os resultados das análises de FT-IR sugerem que o laser promoveu aumento de colágeno no tecido muscular.

A informação de que a LLLT possa estimular a síntese de fibras colágenas tem sido alvo de investigação por diversos autores (YAMAMOTO *et al.*, 1996; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; PUGLIESE *et al.*, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2011), uma vez que a fase fibrótica do reparo muscular (após 14 dias, com pico aos 21 dias pós-lesão) é caracterizada pela síntese de colágeno, como maior componente da MEC dos músculos, em especial o colágeno dos tipos I e III. O colágeno tipo I é mais comum no tecido conjuntivo denso, sendo este necessário para a estabilização da arquitetura tecidual, enquanto que o colágeno tipo III é mais comumente encontrado no tecido conjuntivo frouxo, com importante função na elasticidade tecidual. No músculo

esquelético o colágeno desempenha um importante papel na manutenção da integridade funcional das fibras e na adequada transmissão de força durante a contração muscular (SOUZA *et al.*, 2011). Como sugestão para o nosso estudo, incluiríamos técnicas histológicas de coloração, como p. ex. o Tricômico de *Masson*, o qual nos permitiria visualizar a possível presença de colágeno no tecido muscular, não observada por meio da técnica de H&E.

A observação importante é que a espectroscopia infravermelha é uma técnica muito sensível e traz informações a nível molecular. Quando se trata de sistemas biológicos, as bandas são mais largas devido à superposição de vários componentes o que não acontece nos compostos puros como medicamentos. Assim, é comum o uso de cálculo de áreas para sistemas biológicos.

Considerações sobre a LLLT e o tecido biológico

Os comprimentos de onda variando do ultravioleta (UV) até o infravermelho (247-1300nm), com mínima densidade de energia (4J/cm²), têm sido eficazes na estimulação de processos biológicos (CHANCE; NIOKA; KENT *et al.*, 1988; BEAUVOIT; KITAI; CHANCE, 1994; BEAUVOIT *et al.*, 1995; WHELAN *et al.*, 2001; DeSMET *et al.*, 2006), como aceleração de processos cicatriciais, aumento do crescimento de várias linhagens de células, incluindo osteoblastos, células musculares esqueléticas, células satélites (BEN-DOV *et al.*, 1999), células epiteliais, condrócitos e colágeno tipo II (WHELAN *et al.*, 2001; AL-WATBAN & ANDRES, 2003; BAROLET *et al.*, 2009; OSHIMA *et al.*, 2011).

A resposta inflamatória a um trauma direto é caracterizada pela presença e ativação de neutrófilos no local da lesão, principalmente nas primeiras 2 horas. Neste estágio mais precoce, as células mortas são removidas, seguido pela resposta regenerativa durante a qual as células satélites proliferam-se para reestruturar o músculo lesionado (SOMMER *et al.*, 2001). Daí a opção por iniciar nosso tratamento no período de 3h pós-injeção de *Bjssu*, assim como pela tentativa de mimetizar uma situação real de acidente ofídico, em que as vítimas geralmente demoram algumas horas até receberem o devido atendimento médico.

Há evidências na literatura de que a bioestimulação por meio do laser produza um efeito primário no processo de reparo do músculo. Este efeito pode ser caracterizado pelo aumento da proliferação celular, aumento da síntese de colágeno e pela ativação de fatores de crescimento (YU; NAIM; MCGOWAN, 1997; O'BRIEN *et al.*, 1998).

Em nosso estudo morfológico foi possível observar intenso aumento da celularidade nos grupos que foram submetidos à injeção de *Bjssu*, assim como nos grupos *Bjssu* + laser, mesmo para o período mais tardio (72 h). De acordo com Shefer e colaboradores (2002), ao ser utilizado para promover a regeneração do músculo esquelético, o laser é capaz de ativar células satélites quiescentes e estimular sua proliferação. É também possível citar o efeito inibitório na morte celular, uma vez que as células do tecido irradiado não morrem por apoptose, diferentemente daquelas não irradiadas (COSTARDI *et al.*, 2008).

Esta informação está de acordo com os dados encontrados em nosso estudo, uma vez que a área de lesão dos grupos VL48 e VL72 foi menor quando

comparada aos grupos V48 e V72, evidenciando o possível efeito protetor promovido pela LLLT. Nesse contexto, Assis e colaboradores (2012) verificaram que o laser 808nm reduziu a área de lesão após quatro dias de tratamento em criolesão realizada no m. tibial anterior de ratos. No estudo de Brunelli e colaboradores (2013), o laser GaAlAs (780nm) foi capaz de reduzir a área de lesão do m. tibial anterior após 7 dias de tratamento com LLLT.

Para ser eficiente, o uso do laser deve seguir dosimetria adequada. No entanto, perante a gama de experimentos envolvendo a LLLT, vários efeitos têm sido relatados com o uso de diferentes densidades de energia. Em nosso estudo preconizamos a dose de 4J/cm². Esta escolha foi baseada nas recomendações dadas pela “*World Association of Laser Therapy*” (WALT) sobre o uso da LLLT no músculo esquelético, considerando sua distribuição corporal, profundidade em que se encontram as fibras, o tipo de fibras prevalentes, função motora, entre outras especificações.

Diferentes autores utilizaram como critério de dosagem para analgesia, a densidade de energia entre 2 a 4J/cm²; efeito antiinflamatório de 1 a 3J/cm²; efeito cicatrizante de 3 a 6J/cm² e circulatório de 1 a 3J/cm², sendo que o ideal é que a energia não ultrapasse 40J/cm² (CRESSONI, 2009).

Em animais submetidos à lesão muscular e tratados com LLLT, é possível observar com destaque o surgimento de novas miofibras, sugerindo que as células satélites são as grandes responsáveis pela resposta à irradiação. Essa teoria deve-se a estudos do efeito da LLLT em culturas de células satélites que

revelaram a indução do ciclo celular de regulação proteica com acréscimo da proliferação e inibição da diferenciação celular (SHEFER *et al.*, 2002).

Oliveira, Oliveira e Soares (2008) compararam os efeitos da LLLT com a irradiação por ultrassom pulsado de baixa intensidade na proliferação de células L929 de fibroblastos do tecido conjuntivo de ratos. Os autores verificaram que a LLLT (GaAs – 904nm) provocou efeitos superiores na cultura celular fibroblástica quando comparado aos do ultrassom, demonstrando um maior efeito na taxa de crescimento celular para a dose de 50mJ/cm² nas primeiras 24 e 48h.

Há trabalhos que questionam a variabilidade dos efeitos do laser HeNe quanto às peculiaridades de cada espécie animal. Neste contexto, Buliakova e colaboradores (1992) sugeriram que a LLLT possua mais eficácia em ratos do que nos experimentos realizados no m. gastrocnêmio de suínos. No entanto, mesmo para esta espécie animal, os autores demonstraram que a LLLT no pós-operatório estimula a atividade da fibrina, contém a degeneração das fibras musculares, incrementa a síntese de moléculas de DNA e RNA e a regeneração tissular.

Nos últimos anos, muito foram os estudos sobre os efeitos da LLLT na respiração celular, principalmente na citocromo c oxidase (complexo IV da mitocôndria), conforme citado por Karu (2010) sobre os incrementos da produção de ATP. Apesar da citocromo c oxidase absorver a irradiação laser preferencialmente na região do vermelho e infravermelho próximo (com picos em 620, 680, 760 e 825nm), Silveira e colaboradores (2009) demonstraram que o laser infravermelho (GaAs – 904 nm) também promove aumento da atividade dos complexos I, II, III e IV em gastrocnêmios de ratos submetidos a lesão muscular.

As manifestações locais do acidente botrópico são evidentes nas primeiras horas após a picada e constituem presença de edema, dor e equimose. As principais complicações são decorrentes da necrose e da infecção secundária que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro.

Após uma lesão ou um procedimento terapêutico qualquer é relativamente fácil realizar a avaliação da recuperação funcional em humanos, porém, torna-se muito difícil a padronização de condições experimentais com cobaias. Esta situação levou à busca por métodos específicos de avaliação funcional envolvendo animais de experimentação.

A análise da marcha parece representar um excelente método de avaliação da recuperação funcional, sendo ela motora e sensitiva, após lesão nervosa ou alguma situação semelhante que promova os mesmos déficits funcionais como, por exemplo, a lesão muscular. Os desequilíbrios remanescentes a partir desses processos comprometem as fases da marcha (VAREJÃO *et al.*, 2002).

O método padrão para analisar a recuperação funcional é o Índice Funcional do Ciático (IFC; em inglês, *Sciatic Functional Index*, ou SFI) (VAREJÃO *et al.*, 2002), criado por De Medinaceli e colaboradores (1982). Consiste em um sistema quantitativo da condição funcional do nervo ciático (isquiático) de ratos para a avaliação do grau de lesão e da recuperação (BERVAR, 2000). O método baseia-se na medida de parâmetros pré-estabelecidos nas impressões da pata traseira dos animais ao caminharem sobre filme radiográfico disposto sobre uma passarela de acrílico. Ao caminhar, o animal deixa as impressões da pata traseira

no filme, por estarem embebidas em substância reveladora (MONTE-RASO, 2006).

Além do SFI (De MEDINACELI *et al.*, 1982; BAIN *et al.*, 1989), também utiliza-se o Índice Ciático Estático (ICE; em inglês *Static Sciatic Index* ou SSI) (BERVAR, 2000; BOZKURT *et al.*, 2008), o *fator de postura* (WALKER *et al.*, 1994); *cinemática de tornozelo* (SANTOS; WILLIAMS; THOMAS, 1995), TOA (*toe out angle*) (VAREJÃO *et al.*, 2003) e o sistema CatWalk, que consiste em uma análise da função motora dinâmica (BOZKURT *et al.*, 2011).

Andraus, Barbieri e Mazzer (2010) utilizaram o laser (GaAIs), com comprimento de onda de 830nm (100 mW, modo contínuo, dose de 140 J/cm²), durante 21 dias consecutivos sobre o nervo fibular comum de ratos, submetidos a lesão por esmagamento, iniciando no primeiro dia pós-operatório. Os autores avaliaram a marcha por meio do tempo de percurso na passarela e o índice funcional do fibular (PFI). O tempo de marcha e o PFI melhoraram significativamente no grupo de ratos irradiados com laser, mostrando que este recurso acelerou e melhorou a regeneração do nervo fibular do rato.

Métodos como o SFI são destinados à avaliação funcional relativa a desordens de origem nervosa. Não existem dados disponíveis suficientes sobre a locomoção envolvendo acometimentos do sistema muscular. Não se sabe se a reparação da estrutura e função dos músculos está completa quando as características de locomoção já se recuperaram totalmente (IWATA *et al.*, 2010).

Foi baseado nos modelos de estudo da função motora que realizamos a análise da marcha dos camundongos submetidos à injeção de *Bjssu* para

observar o comportamento funcional nos casos de acidente botrópico. Os resultados mostraram uma clara relação com os quadros epidemiológicos em humanos, configurando perda de função nas primeiras horas após o envenenamento. Em nosso estudo, o período de 3h pós-lesão foi considerado crítico para perda da função motora do membro posterior direito, sendo reestabelecida após 24 horas.

Os animais do grupo V, ao serem avaliados no período de 3h pós-injeção de *Bjssu* não realizaram apoio do MPD, fazendo com que todos os parâmetros relacionados à fase de apoio da marcha fossem considerados “nulos”. Possivelmente, a posição de semiflexão do MPD caracteriza postura flexora reflexa à sensação dolorosa provocada pelo veneno, bem como pela presença de edema e a consequente pressão do mesmo sob as terminações nervosas.

De maneira geral, a condição dolorosa resulta em incapacidade e inabilidade, tendo como principal função a proteção do organismo. Permanecendo, a dor pode resultar em hipotrofia muscular, hábitos de desuso e à consciente ou inconsciente proteção, as quais podem levar à perda grave da função muscular (TEIXEIRA; MARCON; FIGUEIRÓ, 2001; BORATO *et al.*, 2008).

Segundo Ben-Dov e colaboradores (1999), Amaral e colaboradores (2001) e Shefer e colaboradores (2002) e (2003), o laser aplicado nas primeiras horas pós-lesão otimiza o processo reparativo do tecido muscular pelo aumento da mobilidade mioblástica e de miofibrilas jovens com proliferação de células satélites e neoformação de vasos sanguíneos na área irradiada. De acordo com o protocolo utilizado em nosso estudo, foi preconizada a aplicação da LLLT 3h após a injeção

de *Bjssu*. Nesse período ocorrem as principais manifestações inflamatórias, a partir das quais tem início o processo de reparo.

O laser GaAs promoveu uma sensível melhora da funcionalidade da marcha avaliada por meio do sistema CatWalk. Os efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes dessa terapia estão intimamente relacionados à recuperação funcional. Em função do conjunto de efeitos benéficos, o restabelecimento funcional seria mais rápido e com melhores características nos aspectos qualitativos e de tempo (VEÇOSO, 1993; VALE, 2008)

Atualmente, a função muscular é estimada pela força muscular máxima, avaliada durante o processo de recuperação de lesões musculares. Estudos demonstram que a força isométrica diminui imediatamente após a lesão, recuperando-se ao longo do tempo. De modo geral, as causas das perdas funcionais relacionadas às lesões musculares são estudadas por meio da observação histológica. No entanto, há pouca informação disponível sobre as relações entre recuperação morfológica e funcional (CRISCO *et al.*, 1994; SONG; NAKAZATO; NAKAJIMA, 2004).

De acordo com Iwata e colaboradores (2010), a recuperação funcional do músculo-esquelético ocorre previamente à regeneração estrutural, ao passo que é necessária 90% da força muscular para reestabelecer a locomoção normal. Em nosso estudo, não realizamos testes de força muscular, porém os animais que receberam injeção de *Bjssu* e permaneceram sem tratamento (grupos V e VLP), tiveram sua função restituída 24h após a indução da mionecrose, corroborando

com a ideia de que o retorno da função precede a normalização da estrutura muscular, que ainda se apresentou afetada no período de 72h pós-lesão.

Sobre o uso do método CatWalk até o presente momento, os estudos mostraram sua empregabilidade especialmente na análise da função motora em modelos de dor (GABRIEL *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2009), lesão do nervo isquiático (DEUMENS *et al.*, 2007; BOZKURT *et al.*, 2008) e osteoartrite induzida (ANGEBY-MOLLER; BERGE; HAMERS, 2008; FERREIRA-GOMES; ADAES; CASTRO-LOPES, 2008). Em nenhum outro trabalho o método foi previamente utilizado para análise da função motora dinâmica em animais submetidos à mionecrose por *Bjssu* ou outro veneno com características semelhantes.

Os parâmetros mensurados pelo CatWalk, na maioria das vezes, estão relacionados às características intrínsecas da pisada do animal, como no estudo de Vandeputte e colaboradores (2010), que verificaram a área, comprimento e área máxima da pisada, em modelo de estudo de doença de Parkinson e doença de Huntington. Esses parâmetros podem refletir condições degenerativas do SNC e/ou SNP. Em nosso estudo, as variáveis funcionais selecionadas estão relacionadas às características espaço-temporais da marcha, principalmente à fase de apoio, sendo que todas elas apresentaram sensibilidade às alterações provocadas pela mionecrose do m. gastrocnêmio, principalmente no período de 3h pós-lesão.

Os grupos S, SL e SLP foram incluídos na análise para observarmos se a injeção (a perfuração promovida pela agulha, propriamente dita) provocaria algum efeito nocivo – provavelmente doloroso – que interferisse em algum dos

parâmetros da função motora avaliados. Os resultados mostraram correlação com a análise morfológica, o qual não apresentou alterações no tecido muscular pela injeção de *NaCl* 0,9%.

O músculo gastrocnêmio é de extrema importância na fase de apoio da marcha. É uma estrutura que trabalha em condições de atividade física extremas, com grande risco de lesões e rupturas de suas fibras (JÄRVINEN *et al.*, 1992; CARAZZATO, 1994; JÄRVINEN *et al.*, 2000). A contração reflexa do gastrocnêmio leva o MP a permanecer em tríplice-flexão e, no caso dos nossos animais, refletiram na elevação do membro.

Poucos estudos demonstraram os efeitos do laser na marcha. Os existentes utilizam o SFI, por este ser um índice largamente utilizado, porém restrito à regeneração nervosa. A respeito de outros testes existentes, Tonussi e Ferreira (1992) descreveram o teste de incapacidade articular, no qual os animais são colocados sobre um cilindro metálico com 30cm de diâmetro realizando 3rpm. O cilindro é recoberto por uma tela metálica e conectado a um dispositivo eletrônico e este a um computador. Esse teste serve para mensurar o tempo em que o animal permanece com a pata em elevação (TEP) durante um minuto, por meio de botas metálicas que são encaixadas nas patas posteriores do animal.

De acordo com Bressan, Cunha e Tonussi (2006), animais que não sofreram algum tipo de lesão (controles intactos) apresentam TEP por volta de 10 s; este valor aumenta quando o animal está apresentando dor e permanece mais tempo com o membro elevado.

Sobre este modelo de avaliação da função motora, Borato e colaboradores (2008) realizaram o teste de incapacidade em ratos submetidos à lesão muscular do gastrocnêmio direito, induzida por formalina (5%) e tratados com laser 830nm (100 mW, doses de 20, 50 e 100J/cm²). Os autores realizaram o teste no momento pré-lesão, 5min, 2, 8 e 24h pós-lesão e observaram que em todos os momentos da análise, mesmo para os grupos tratados com diferentes doses de laser, não houve diferenças significativas, porém todos os períodos pós-lesão apresentaram maior TEP em relação ao controle. Em nosso estudo, os animais dos grupos V e VLP permaneceram durante todo o trajeto percorrido com o MPD elevado no período de 3h pós-lesão, no tempo máximo de 8s.

Expressão gênica

O processo de regeneração do músculo esquelético é iniciado a partir de estímulos químicos ou mecânicos que levam a ativação das células satélites (HURME & KALIMO, 1992; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005). Já foi comprovado que o evento lesivo induz a liberação de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico e que estas substâncias promovam a ativação das células satélites (EHRHARDT & MORGAN, 2005; FILIPPIN *et al.*, 2011). Existem evidências de que a LLLT estimule esses e outros eventos celulares, como a expressão de fatores de transcrição MRFs, como *MyoD* e *Miogenina*, considerados marcadores da hiperplasia e hipertrofia muscular (SHEFER *et al.*, 2001; SHEFER *et al.*, 2002; ASSIS *et al.*, 2013).

O aumento da expressão dos genes da família MRF, que inclui *MyoD*, *Miogenina*, *Myf-5* e *MRF4*, tem sido observado em modelos de estudo de músculos denervados, em membros posteriores de camundongos senescentes e em processos de regeneração do músculo esquelético em ratos jovens (8 – 12 semanas de idade) (MARSH *et al.*, 1997). Füchtbauer e Westphal (1992) analisaram a expressão de *MyoD* e *miogenina* no músculo esquelético em regeneração e concluíram que há suprarregulação desses dois genes principalmente nas duas primeiras semanas após o evento lesivo.

Há escassez na literatura acerca de trabalhos envolvendo o uso do laser no tratamento da mionecrose induzida por veneno botrópico. Um estudo similar, porém, com aplicação de crotoxina (CTX) no músculo tibial anterior de camundongos C57B16, avaliou a expressão de *MyoD* e *Miogenina* oito dias após a injeção do veneno com tratamentos diários de laser GaAs. Silva e colaboradores (2012) verificaram, nesse estudo, aumento da expressão de *MyoD* no grupo tratado com dose laser de 1,5J. Em nosso estudo, a expressão de *MyoD* manteve-se inalterada em todos os grupos em relação ao controle, de forma que o laser não surtiu efeito positivo no aumento da expressão desse gene.

Por outro lado, Silva e colaboradores observaram que a expressão de *MyoD* nos grupos sem tratamento e nos grupos submetidos ao laser, porém sem lesão prévia (equivalente aos nossos grupos SL48 e SL72), mantiveram-se inalteradas, de maneira similar aos nossos resultados.

Em nosso estudo, o laser foi capaz de promover o aumento da expressão de *Miogenina* no período de 72 horas pós-lesão, porém a principal diferença

ocorreu em relação ao grupo V72. Os demais grupos permaneceram com os mesmos níveis de expressão do grupo controle. No trabalho de Silva e colaboradores (2012) ocorreu aumento na expressão de *Miogenina* tanto no grupo veneno quanto nos grupos veneno tratados com laser (3J), sendo ambas as diferenças em relação ao grupo controle.

Em modelo similar de indução da mionecrose, Marsh e colaboradores (1997) observaram o retorno da massa muscular do tibial anterior de ratos 21 dias após a injeção de bupivacaína. Os autores relataram que durante a regeneração muscular, a expressão de *MyoD* e *Miogenina* aumentou significativamente 5 dias após a injeção e, no caso do *MyoD*, retornou aos níveis controle 14 dias pós-lesão. Essa informação pode justificar a ideia de que a expressão de *MyoD* em nosso trabalho tenha sido menor pelo fato de que nossa análise contemplou até o terceiro dia pós-lesão (72h).

Assis e colaboradores (2013) observaram que quatro dias após criolesão do músculo tibial anterior de ratos, a expressão de *MyoD* e *Miogenina* aumentou em 13 e em 90 vezes, respectivamente. Nos grupos tratados com laser 808nm, a expressão de *MyoD* mais que duplicou. Os autores utilizaram a região proximal do músculo tibial anterior para extração do RNA. Em nosso estudo, o m. gastrocnêmio foi considerado em sua totalidade, descartando apenas as regiões miotendíneas proximal e distal. Messa (2008) utilizou as regiões distais do m. sóleo para retirada do RNA total, porém descreve que a distribuição dos MRFs ao longo das fibras musculares é contraditória (CARSON & BOOTH, 1998; ZÁDOR *et al.*, 1999; HILL & GOOLDSPINK, 2003).

De maneira geral, a elevação nos níveis de *MyoD* está relacionada à proliferação de células satélites, iniciada até 48h após estímulos hipertróficos ou em processos de regeneração, os quais também são responsáveis por induzir a expressão de MRFs, como relatado no estudo de Grounds e colaboradores (1992), em que foi observado pico de expressão de *MyoD* em células mononucleares 24h após um estímulo lesivo. Em nosso estudo, o primeiro período de análise foi em 48h pós-lesão. Dessa forma, os relatos de Grounds e colaboradores (1992) talvez justifiquem os nossos achados de baixa expressão de *MyoD* em períodos mais tardios.

A densidade de energia da irradiação pode influenciar a expressão gênica positiva ou negativamente, como demonstrado por Rodrigues e colaboradores (2013) que avaliaram a expressão de *MyoD* e *Miogenina* nos períodos de 7, 14 e 21 dias após induzirem criolesão do músculo tibial anterior. Os autores utilizaram duas diferentes densidades de energia (10 e 50J/cm²) e verificaram que houve maior regulação de *MyoD* com a maior dose (50 J/cm²), exceto para o período de 21 dias. Já a expressão de *miogenina* foi diminuída em ambos os grupos tratados após 7 dias, porém, ocorreu suprarregulação desse gene com a dose de 10J/cm² após 21 dias.

Por meio da técnica de imunohistoquímica, Brunelli e colaboradores (2013) verificaram maior imunoexpressão de *MyoD* no período de 7 dias após criolesão do músculo tibial anterior e tratamento diário com laser 780nm. Já em períodos mais tardios (14 e 21 dias) os autores não mais observaram expressão significativa de *MyoD*. No entanto, a imunoexpressão de *miogenina* foi maior tanto

no período de 7 como de 14 dias pós-lesão, sem detecção significativa após 21 dias.

Após a lesão muscular as células satélites são rapidamente ativadas, entram no ciclo celular e proliferam-se, gerando mioblastos que irão se fundir para formar novas fibras musculares. Em seguida, novas células satélites quiescentes são geradas durante a homeostase do tecido muscular (SAMBASIVAN & TAJBAKSH, 2007; TEDESCO *et al.*, 2010; SAMBASIVAN *et al.*, 2011). *Pax7* é expresso tanto durante a quiescência quanto na ativação das células satélites, sendo esse gene menos expresso durante a diferenciação do músculo esquelético (KUANG & RUDNICKI, 2008; SAMBASIVAN & TAJBAKSH, 2007; TEDESCO *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a expressão relativa de *Pax7* foi significativamente menor em todos os grupos experimentais quando comparados ao GC, exceto para o grupo SL72. Não existem outros trabalhos que verificaram a expressão desse gene em modelo de lesão botrópica associada à LLLT. De acordo com Lepper, Conway e Fan (2009) as células satélites do músculo adulto nem sempre precisarão de *Pax7* para sua auto-renovação ou para regeneração muscular, caracterizando uma diferença crucial em relação ao desenvolvimento embrionário e/ou perinatal. Da mesma forma, para Sambasivan e colaboradores (2011), uma variedade de células do tipo “não-satélites” podem participar da regeneração do músculo adulto. Podemos pensar que, dentre outros fatores, tais questões justificassem a baixa regulação de *Pax7* em nossos grupos.

Segundo Le Grand e Rudnicki (2007), após a ativação, as células satélites deixam seu nicho e se movem para fora da lâmina basal. Nesse momento é iniciada a expressão de *Pax7* e *MyoD*. Os “descendentes” dessa ativação, os mioblastos, passam por vários estágios de divisão celular e deixam de expressar *Pax7*, passando à fase de diferenciação, com suprarregulação de *miogenina*, que mais tarde será responsável pela fusão dos mioblastos e formação das miofibras multinucleadas⁶. A partir dessa informação, podemos aferir que, possivelmente, o período de 48h pós-lesão (primeiro período avaliado quando à expressão gênica) já teria sucedido o período de ativação das células satélites. Isso ajudaria a justificar a baixa expressão de *Pax7* e o início da suprarregulação de *miogenina*, marcando o processo de diferenciação.

Outra justificativa para os resultados encontrados em nosso estudo pode ser baseada nos relatos de Kääriäinen e colaboradores (2000)⁷, sobre os eventos que seguem a lesão do músculo esquelético. Os autores descrevem a ativação das células satélites em até 12h e a proliferação nas primeiras 24h após o evento lesivo. O período de 48h (2-3 dias) é marcado pelo início da diferenciação das células satélites em mioblastos e fusão em miotubos. Podemos pensar que a suprarregulação significativa de *miogenina* somente no período de 72h pós-lesão era esperada; vale ressaltar também o efeito positivo da LLLT nesse processo.

⁶ Consultar “Representação esquemática da miogênese de células adultas” (adaptado de Le Grand & Rudnicki, 2007) à pág. 41.

⁷ Consultar “Sequência de tempo e eventos durante a regeneração muscular” (adaptado de KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2000) à pág. 37.

7 - CONCLUSÕES

- 1 O método *CatWalk* mostrou sensibilidade em mensurar as alterações da função motora dinâmica provocadas pela mionecrose. Da mesma forma, a LLLT influenciou positivamente o padrão de marcha dos animais nas primeiras horas após a injeção de *Bjssu*;
- 2 O laser foi capaz de aumentar a expressão de *Miogenina* no período de 72 horas pós-lesão;
- 3 A área de infiltrado inflamatório observada nos cortes histológicos dos grupos que receberam injeção de *Bjssu* foi significativamente menor naqueles submetidos a LLLT, caracterizando efeito protetor a evolução da mionecrose;
- 4 Os espectros no infravermelho sugeriram que o tratamento com laser acelera a recuperação tecidual;

Conclusão geral:

O laser GaAs (904nm) influenciou positivamente o processo de reparo tecidual dos músculos submetidos a mionecrose nos primeiros três dias após o evento lesivo, baseado na melhora da função motora dinâmica, expressão significativa de *Miogenina* na fase de diferenciação/hipertrofia do músculo esquelético, menor área mionecrótica comparada aos grupos “Veneno” e presença de bandas relativas a estrutura secundária do colágeno como importante fator para a reconstituição da arquitetura muscular.

REFERÊNCIAS

AGNOL, M. A. D.; NICOLAU, R. A.; LIMA, C. J.; MUNIN, E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med Sci.** v. 24, p. 909-916, 2009.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de genhiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação.** 2003. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais), Interunidades: IFSC/IQSC/EESC da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

AL-WATBAN, F. A.; ANDRES, B. L. Polychromatic LED therapy in burn healing of nondiabetic and diabetic rats. **J Clin Laser Med Surg.** v. 21, n. 5, p. 249-258, 2003.

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.** v. 16, n. 1, p. 44-51, 2001.

ANGEBY-MOLLER, K.; BERGE, O. G.; HAMERS, F. P. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. **J Neurosci Methods.** v. 174, n. 1, p. 1-9, 2008.

ANDRAUS, R. A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. A irradiação com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta Ortop Bras.** v. 18, n. 3, p. 152-157, 2010.

ARMPFIELD, D. R.; KIM, D. H. M.; TOWERS, J. D.; BRADLEY, J. P.; ROBERTSON, D. D. Sports-related muscle injury in the lower extremity. **Clinics in Sports Medicine.** v. 25, n. 4, p. 803, 2006.

ARRINGTON, E. D.; MILLER, M. D. Skeletal muscle injuries. **Orthopedic Clinics of North America.** v. 26, n. 3, p. 411-421, 1995.

ARTILHEIRO, P. P.; BARBOSA, J. L. P.; FERNANDES, K. P. S.; OLIVEIRA, T. S.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. **Fisioter. Mov.** v. 25, n. 1, p. 21-29, 2012.

ASSIS, L.; MORETTI, A. I. S.; ABRAHÃO, T. B.; SOUZA, H. P.; HAMBLIN, M. R.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (808nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Surg Med.** v. 28, n. 3, p. 947-955, 2013.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**. v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**. v. 83, p. 129-138, 1989.

BAPTISTA, J.; MARTINS, M. D.; PAVESI, V. C.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P.; PINTO-JÚNIOR DDOS, S.; FERRARI, R. A. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. **Photomed Laser Surg**. v. 29, p. 11-7, 2011.

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, p. 1236-1244, 2008.

BARRAVIERA, B. Estudos clínicos dos acidentes ofídicos: revisão. **JBM**, São Paulo, v. 65. n. 4, p. 209-250, 1993.

BAROLET, D.; ROBERGE, C. J.; AUGER, F. A.; BOUCHER, A.; GERMAIN, L. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. **J Invest Dermatol**. v. 129, n. 12, p. 2751-2759, 2009.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.

_____. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

BEGHINI, D. G.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; RANDAZZO-MOURA, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Crossneutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**. v. 46, p. 604–611, 2005.

BEINER, J. M.; JOKL, P. Muscle contusion injury and myositis ossificans traumatica. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 403, p. S110-S119, 2002.

BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINITCHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1448, n. 3, p. 372-380, 1999.

BERTOLONI, G.; SACCHETTO, R.; BARO, E.; CECCHERELLI, E.; JORI, G. Biochemical and morphological changes in *Escherichia coli* irradiated by coherent and non-coherent 632.8 nm light. **Photochem. Photobiol. B Biol.** v. 18, p. 191, 1993.

BERVAR, M. Video analysis of standing - an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **J Neurosci Meth.** v. 102, p. 109-116, 2000.

BEAUVOIT, B.; KITAI, T.; CHANCE, B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach. **Biophys. J.** v. 67, n. 6, p. 2501-2510, 1994.

BEAUVOIT, B.; EVANS, S. M.; JENKINS, T. W.; MILLER, E. E.; CHANCE, B. Correlation between the light scattering and the mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumors. **Anal. Biochem.** v. 226, p.167-174, 1994.

BORATO, E.; OLIVEIRA, J. J. J.; CIENA, A. P.; BERTOLINI, G. R. F. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. **Rev Bras Med Esporte.** v. 14, n. 5, p. 446-449, 2008.

BOZKURT, A.; DEUMENS, R.; SCHEFFEL, J.; O'DEY, D. M.; WEIS, J.; JOOSTEN, E. A.; FUHRMANN, T.; BROOK, G. A.; PALLUA, N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. **J Neurosci Methods.** v. 173, n. 1, p. 91-98, 2008.

BOZKURT, A.; THOLL, S.; WEHNER, S.; TANK, J.; CORTESE, M.; O'DEY, D.; DEUMENS, R.; LASSNER, F.; SCHÜGNER, F.; GRÖGER, A.; SMEETS, R.; BROOK, G.; PALLUA, N. Evaluation of functional nerve recovery with Visual-SSI—a novel computerized approach for the assessment of the static sciatic index (SSI). **J Neurosci Methods.** v. 170, p. 117-122, 2008.

BOZKURT, A.; SCHEFFEL, J.; BROOK, G. A.; JOOSTEN, E. A.; SUSCHEK, C. V.; O'DEY, D. M.; PALLUA, N.; DEUMENS, R. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. **Behavioural Brain Research.** v. 219, n.1, p. 55-62, 2011.

BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine.** v. 36, n. 1-2, p. 83-89, 2006.

BULIAKOVA, N. V.; TELEGINA, T. A.; IL'IASOVA, S. H. G.; BEKHOEV, I. D.; AZAROVA, V. S. Effects of helium-neon laser on regeneration capacity of skeletal muscles of adult guinea pigs. **Biulleten' Eksperimental' noi Biologii i Meditsiny.** v. 113, n. 4, p. 411-414, 1992.

BUNN, J. R.; CANNING, J.; BURKE, G.; MUSHIPE, M.; MARSH, D. R.; LI, G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. **J Orthop Res**. v. 22, n. 6, p. 1336-1344, 2004.

CANNON, J. G.; St PIERRE, B. A. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. **Mol Cell Biochem**. v. 179, n. 1-2, p. 159-167, 1998.

CARAZZATO, J. G. **Lesões músculo-esqueléticas e seu tratamento**. Revista Brasileira de Ortopedia, Belo Horizonte, v. 29, p. 723-728, 1994.

CARRINHO, P. M. **Estudo comparativo utilizando LASERS de 685 nm e 830 nm no processo de reparo tecidual em tendões tenotomizados de ratos**. 2004. 143f. Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CARLSON, C.; BOOTH, F.; GORDON, S. Skeletal muscle myostatin mRNA expression in fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **Am J Physiol**. v. 277, p. 601-606, 1999.

CARSON, J. A.; BOOTH, F. W. Myogenin mRNA is elevated during rapid, slow, and maintenance phases of stretch-induced hypertrophy in chicken slow-tonic muscle. **Pflugers Arch**. v. 435, n. 6, p. 850-858, 1998.

CHANCE, B.; NIOKA, S.; KENT, J., et al. (1988). Time-resolved spectroscopy of hemoglobin and myoglobin in resting and ischemic muscle. **Anal. Biochem**. v. 174, p. 698-707, 1988.

CHARGÉ, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**. v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CHAZAUD, B.; SONNET, C.; LAFUSTE, P.; BASSEZ, G.; RIMANIOL, A. C.; PORON, F.; AUTHIER, F. J.; DREYFUS, P. A.; GHERARDI, R. K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of Cell Biology**. v. 163, n.5, p. 1133-1143, 2003.

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.

CHOO-SMITH, L. P.; EDWARDS, H. G. M.; ENDTZ, H. P.; KROS, J. M.; HEULE, F.; BARR, H.; ROBINSON-JR, J. S.; BRUINING, H. A.; PUPPELS, G. J. Medical applications of raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. **Biopolymers (Biospectroscopy)**. v. 67, p. 1-9, 2002.

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAÚJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**. v. 55, n. 7, p. 1222–1235, 2010.

COSSEAU, C.; AZZI, A.; SMITH, K.; FREITAG, M.; MITTA, G.; GRUNAU, C. Native chromatin immunoprecipitation (*N-ChIP*) and *ChIP-Seq* of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. **Molecular and biochemical Parasitology**. v. 166, n. 1, p. 70-6, 2009.

COSTARDI, C. H. Z.; TAMACHIRO, C.; ESTEVES, I.; GOMES, A.C. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. **Fisioter. Mov.** v. 21, n. 2, p. 21-30, 2008.

CRESSONI, M. D. C. **Influência do laser AsGaAl sobre a cartilagem epifisária de ratos**. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model - biomechanics, physiology, and histology. **American Journal of Sports**. v. 22, n. 5, p. 702-710, 1994.

De MEDINACELI, L.; FREED, W. J.; WYATT, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol**. v. 77, p. 634 – 643, 1982.

DeSMET, K. D.; PAZ, D. A.; CORRY, J. J.; EELLS, J., et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, n. 2, p. 121-128, 2006.

DEUMENS, R.; JAKEN, R. J.; MARCUS, M. A.; JOOSTEN, E. A. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. **J Neurosci Methods**. v. 164, n. 1, p. 120-130, 2007.

DIAS-SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I., et al. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of *Bothrops* species. **Memórias do Instituto Butantan**. v. 51, p. 153–168, 1989.

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, p. 63-69, 2009.

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, p. 352-357, 2003.

DOURADO, D. M.; FÁVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P. T. C.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cell of mice gastrocnemius exposed to snake venom. **Photochemistry and Photobiology**. v. 87, n. 2, p. 418-426, 2011.

EHRHARDT, J.; MORGAN, J. Regenerative capacity of skeletal muscle. **Curr Opin Neurol**. v. 18, n. 5, p. 548–553, 2005.

ENGERT, J. C.; BERGLUND, E. B.; ROSENTHAL, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. **Journal of Cell Biology**. v. 135, n. 2, p. 431-440, 1996.

EL SAYED, S. A.; DYSON, M. Comparisson of the effect of multiwavelength lightproduced by a clister of semiconductor diodes each individual diode on master cell numberand phosphorus metabolism. **Laser Surg Med**. v. 10, p. 559-568, 1990.

FAN, H. W.; CARDOSO, J. L. **Clinical toxicology of snake bites in South America**. In: Meier J, White J, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Florida: CRC Press; p 667–688, 1995.

FERREIRA-GOMES, J.; ADAES, S.; CASTRO-LOPES, J. M. Assessment of movement evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. **J Pain**. v. 9, n. 10, p. 945-954, 2008.

FILIPPIN, L. I.; CUEVAS, M. J.; LIMA, E.; MARRONI, N. P.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; XAVIER, R. M. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. **Nitric Oxide**. v. 24, n. 1, p. 43-49, 2011.

FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; COOLICAN, S. A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 17, n. 5, p. 481-517, 1996.

FÜCHTBAUER, E. M.; WESTPHAL, H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Dev Dyn**. v. 193, p. 34-39, 1992.

GABRIEL, A. F.; MARCUS, M. A.; HONIG, W. M.; WALENKAMP, G. H.; JOOSTEN, E. A. The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. **J Neurosci Methods**. v. 163, n. 1, p. 9-19, 2007.

GABRIEL, A. F.; MARCUS, M. A.; WALENKAMP, G. H.; JOOSTEN, E. A. The CatWalk method: assessment of mechanical allodynia in experimental chronic pain. **Behav Brain Res**. v. 198, n. 2, p. 477-480, 2009.

GARRETT, W. E. Muscle strain injuries. **American Journal of Sports Medicine**. v. 24, p. 52-58, 1996.

GAUGLITZ, G.; VO-DINH, T. **Handbook of spectroscopy**. New York: Wiley-VCH, 2003.

GHARAIBEH, B.; CHUN-LANSINGER, Y.; HAGEN, T.; INGHAM, S. J. M.; WRIGHT, V.; FU, F.; HUARD, J. Biological approaches to improve skeletal muscle healing after injury and disease. **Birth Defects Research (Part C)**. v. 96, p. 82-94, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M. **Clinical toxicology of snakebite in Central America**. In: Meier J, White J, editors. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Florida: CRC Press; p 645–665, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**. v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Mol. Pathol**. v. 62, p. 28-41, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v. 42, n. 8, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; WARRELL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. Global Snakebite Initiative. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, n. 6, p. 2162, 2013.

HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev**. v. 3, n. 2, p. 183-211, 1990.

HASHMI, J. T.; HUANG, Y-Y.; SHARMA, S. K.; KURUP, D. B.; TABOADA, L.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers Surg. Med**. v. 42, n. 6, p. 450-466, 2010.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Ann. NY Acad. Sci**. v. 1056, p. 486–493, 2005.

HAYASHI, S.; ASO, H.; WATANABE, K.; NARA, H.; ROSE, M.; OHWADA, S., et al. Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 122, n. 5, p. 427-434, 2004.

HILL, M.; GOLDSPINK, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **J. Physiol.** v. 549, p. 409-418, 2003.

HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Seminars in Cell & Dev. Biol.** v. 16, n. 4-5, p. 575-584, 2005.

HURME, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise.** v. 24, n. 2, p. 197-205, 1992.

IWATA, A.; FUCHIOKA, S.; HIRAOKA, K.; MASUHARA, M.; KAMI, K. Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. **Muscle & Nerve,** v. 41, n. 5, p. 694-701, 2010.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIAINEN, M.; AARIMAA, V.; VAITTINEN, S.; KALIMO, H., et al. Muscle injuries: optimising recovery. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** v. 21, n. 2, p. 317-331, 2007.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIAINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med.** v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JÄRVINEN, T. A.; KÄÄRIAINEN, M.; JÄRVINEN, M.; KALIMO, H. Muscle strain injuries. **Curr Opin Rheumatol.** v. 12, n. 2, p. 155-161, 2000.

JÄRVINEN, M. J.; LEHTO, M. U. K. The effects of early mobilization and immobilization on the healing-process following muscle injuries. **Sports Medicine.** v. 15, n. 2, p. 78-89, 1993.

JURDANA, M. Radiation effects on skeletal muscle. **Radiol Oncol.** v. 42, n. 1, p. 15-22, 2008.

KÄÄRIÄINEN, M.; JÄRVINEN, T.; JÄRVINEN, M.; RANTANEN, J.; KALIMO, H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. **Scand J Med Sci Sports.** v. 10, n. 6, p. 332-337, 2000.

KÄÄRIÄINEN, M.; KÄÄRIÄINEN, J.; JÄRVINEN, T. L.; SIEVANEN, H.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. **J Orthop Res.** v. 16, n. 2, p. 197-206, 1998.

KANNUS, P.; PARKKARI, J.; JÄRVINEN, T. L.; JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, M. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. **Scand J Med Sci Sports.** v. 13, n. 3, p. 150-154, 2003.

KARU, T. I.; KALENDO, G. S.; LETOKHOV, V. S.; LOBKO, V. V. Biological action of low-intensity visible light on HeLa cells as a function of the coherence, dose, wavelength, and irradiation dose. **Sov. J. Quantum Electron.** v. 12, p. 1134, 1982.

_____. Biological action of low-intensity visible light on HeLa cells as a function of the coherence, dose, wavelength, and irradiation regime. II. **Sov. J. Quantum Electron.** v. 13, p. 1169, 1983.

KARU, T. I. **Lasers Life Sci.** v. 2, p. 53-64, 1988.

_____. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.** v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

_____. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **Life.** v. 62, n. 8, p. 607-610, 2010.

KARU, T. I.; PYATIBRA T. L. V.; RYABYKH, T. P. Melatonin modulates the action of near infrared radiation on cell adhesion. **J. Pineal Res.** v. 34, p. 167-172, 2003.

KATZIR, A. **Lasers and Optical Fibers in Medicine.** 1^ªed., San Diego – CA: Academic Press, 1993.

KUANG, S.; RUDNICKI, M. A. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. **Trends Mol. Med.** v. 14, p. 82-91, 2008.

LASSAR, A. B.; DAVIS, R. L.; WRIGHT, W. E.; KADESCH, T.; MURRE, C.; VORONOVA, A.; et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. **Cell.** v.66, n. 2, p. 305-315, 1991.

LE GRAND, F.; RUDNICKI, M. A. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 19, p. 628-633, 2007.

LEPPER, C.; CONWAY, S. J.; FAN, C. M. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. **Nature.** v. 460, p. 627-631, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon.** v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIEDMANN, H.; ROCHKIND, S; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 12, p. 305-310, 1992.

MASHA, R. T.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 31, n. 2, p. 47-53, 2013.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther.** v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MESTER, E.; JASZSAGI-NARGY, E. The effects of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophys.** v. 35, p. 227-230, 1973.

MESTER, A. R.; NAGYLUESKAY, S.; MAKO, E.; HOFFMANN, G.; SERENYI, M. Experimental immunological study with radiological application of low-power laser. **Laser in Medicine.** p. 502-512, 1998.

MILANI, R.; JORGE, M. T.; DE CAMPOS, F. P. F.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L. C.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANCA, F. O. S.; SANO - MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDEZ, I. D. O. F.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Snake bites by jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State. Brazil. **Q.J. Med.** v. 90, p. 323-334, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 1999. p. 131.

MONTE-RASO, V. V. **Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos:** avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. 2006. 66f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MOORE, P.; RIDGWAY, T. D.; HIGBEE, R. G.; HOWARD, E. W.; LUCROY, M. D. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg. Med.** v. 36, p. 8-12, 2005.

MOURA-SILVA, A. M.; D'IMPÈRIO-LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A. K.; BRODSKYN, C. I.; DOS SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. D., et al. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon.** v. 28, p.181-188, 1990.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews.** v. 42, p. 493-541, 2007.

NAKANO, J.; KATAOKA, H.; SAKAMOTO, J.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M.; YOSHIMURA, T. Low-level laser irradiation promotes recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol**. v. 94, n. 9, p. 1005-1015, 2009.

NOLTE, S.; DAMASIO, D. C.; BARÉA, A. C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; ZISCHLER, L. F. C. M.; STUELP-CAMPELO, P. M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; REIS, C. A.; MORENO-AMARAL, A. N. BJcuL, a lectin purified from Bothrops jararacussu venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**. v. 59, p. 81-85, 2012.

OLIVEIRA, C. Z. **Efeito do laser de baixa potência AsGa pós-angioplastia na redução da reestenose vascular em coelhos**. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos – SP, 2008.

OLIVEIRA, D. A. A. P.; OLIVEIRA, R. F.; SOARES, C. P. Comparação do efeito da terapia laser de baixa potência e irradiação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade in vitro. **ConScientiae Saúde**. v. 7, n. 4, p. 457-462, 2008.

OLIVEIRA, N. M.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F. GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med**. v. 25, p. 13-21, 1999.

OSHIMA, Y.; COUTTS, R. D.; BADLANI, N. M.; HEALEY, R. M.; KUBO, T.; AMIEL, D. Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 65, p. 224-229, 2011.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**. v. 39, p. 1477-1485, 2001.

PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nat Rev Genet**. v. 4, n. 7, p.497-507, 2003.

PÉREZ, A. V.; SARAVIA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake Bothrops jararacussu. **Toxicon**. v. 49, p. 1063-1069, 2007.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**. v. 26, p. 509-515, 2004.

PILOTTO, S.; PACHECO, M. T.; SILVEIRA, L.; VILLAVERDE A. B.; ZANGARO, R. A. Analysis of near-infrared Raman spectroscopy as a new technique for a transcutaneous non-invasive diagnosis of blood components. **Lasers Med Sci**. v. 16, p. 2-9, 2001.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol Surg**. v. 31, n. 3, p. 334-340, 2005.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui Odontol Bras**. v. 17, p. 307-313, 2003.

QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C.; FONSECA, K. C.; CANABRAVA, L. C. M. N.; FRANÇA, L. V.; SILVA, M. C.; STANZIOLA, L.; BELETTI, M. E.; CANABRAVA, H. A. N.; OLIVEIRA, F. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**. v. 17, n. 1, p. 49-58, 2011.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci. Lett**. v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med**. v. 22, p. 281-287, 1998.

RICHARD-BULTEAU, H.; SERRURIER, B.; CRASSOUS, B.; BANZET, S.; PEINNEQUIN, A.; BIGARD, X.; KOULMANN, N. Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 294, p. 467-476, 2008.

ROODT, A. R.; DOLAB. Á.; J.; FERNANDEZ, T.; SEGRE, L.; HAJOS, S. E. Crossreactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. **Toxicon**. v. 36, p. 1025-1038, 1998.

ROSSI, S. M. **PC-Laser**: um software para simulação de lasers semicondutores. 1994. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação – Universidade Estadual de Campinas, 1994.

SAMBASIVAN, R.; TAJBAKSH, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. **Semin. Cell Dev. Biol.** v. 18, p. 870-882, 2007.

SAMBASIVAN, R.; YAO, R.; KISSENPFENNIG, A.; VAN WITTENBERGHE, L.; PALDI, A.; GAYRAUD-MOREL, B.; GUENOU, H.; MALISSEN, B.; TAJBAKSH, S.; GALY, A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. **Development.** v. 138, p. 3647-3656, 2011.

SANTOS, P. M.; WILLIAMS, S. L.; THOMAS, S. S. Neuromuscular evaluation using rat gait analysis. **J Neurosci Methods.** v. 61, p. 79-84, 1995.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon.** v. 52, n. 8, p. 908-917, 2008.

SCHAFFAZICK, N.; AMARAL, L. S.; FONSECA, T. F.; TOMAZ, M. A.; GABAN, G. A.; BORGES, P. A.; CALIL-ELIAS, S.; NOËL, F.; MELO, P. A.; QUINTAS, L. E. M.; CUNHA, V. M. N. Effect of heparin treatment on the expression and activity of different ion-motive P-type ATPase isoforms from mouse extensor digitorum longus muscle during degeneration and regeneration after *Bothrops jararacussu* venom injection. **Toxicon.** v. 55, p. 52-60, 2010.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols.** v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SCHMITTGEN, T.; ZAKRASEK, B. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods.** v. 46, n. 1-2, p. 69-81, 2000.

SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. **Chemical Reviews.** v. 7, p. 1685-1757, 2003.

SEALE, P.; SABOURIN, L. A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDNICKI, M. A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell.** v. 102, p. 777-786, 2000.

SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein syntheses its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1593, n. 2-3, p. 131-139, 2003.

SHEFER, G.; ORON, U.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; HALEVY, O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. **J Cell Physiol.** v. 187, n. 1, p. 73-80, 2001.

- SHEFER, G.; PARTRIDGE, T. A.; HESLOP, L.; GROSS, J. G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**. v. 115, n. 7, p.1461-469, 2002.
- SHI, X. Z.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**. v. 20, n. 13, p. 1692-1708, 2006.
- SILVA-JÚNIOR, F. P.; ALEXANDRE, G. M. C.; RAMOS, C. H. I.; DE-SIMONE, S. G. On the quaternary structure of a C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom – BJ-32 (BjcuL). **Toxicon**. v. 52, p. 944-953, 2008.
- SILVEIRA, P. C. L.; SILVA, L. A.; FRAGA, D. B.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 95, p. 89-92, 2009.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 490 p.
- SMITH, C. K.; JANNEY, M. J.; ALLEN, R. E. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 159, p. 379-385, 1994.
- SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**. v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000.
- SOLOMON, D.; LEHMANN, J.; KINYANGI, J.; LIANG, B.; SCHÄFER, T. Carbon K-edge NEXAFS and FTIR-ATR spectroscopic investigation of organic carbon speciation in soils. **Sci. Soc. Am. J.** v. 69, p. 107-119, 2005.
- SONG, H.; NAKAZATO, K.; NAKAJIMA, H. Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius: an in vivo rat study. **Am. J. Sports. Med.** v. 32, p. 1263-1269, 2004.
- SOUZA, T. O. F.; MESQUITA, D. A.; FERRARI, R. A. M.; PINTO-JÚNIOR, D. S.; CORREA, L.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; MARTINS, M. D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci**. v. 26, p. 803-814, 2011.
- STONE, N.; KENDALL, C.; SMITH, J.; CROW, P.; BARR, H. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discuss**. v. 126, p. 141-157, 2003.

STUART, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2004. 224 p.

TAJBAKHSH, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. **Journal of Internal Medicine**. v. 266, p. 372-389, 2009.

TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle exb acellular matrix: the effect of loading. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. v. 10, n. 6, p. 321-325, 2000.

TARAC, S.; STOJANOVIC, S. Characteristics of laser light. *Med Pregl*. v. 52, p. 29-34, 1999.

TEDESCO, F. S.; DELLAVALLE, A.; DIAZ-MANERA, J.; MESSINA, G.; COSSU, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. **J. Clin. Invest**. v.120, p. 11-19, 2010.

TEIXEIRA, C. F. P.; ZAMUNÉR, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle & Nerve**. v. 28, n. 4, p. 449-459, 2003.

TEIXEIRA, M. J.; MARCON, R. M.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor, epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Moreira Jr, 2001.

TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med Sci. Sports Exer**. v. 27, n. 7, p. 1022-1032, 1995.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 298, p. 1173-1187, 2010.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**. v. 48, p. 421-427, 1992.

TOUMI, H. T.; BEST, T. T. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? **Br J Sports Med**. v. 37, p. 284-286, 2003.

UTZINGER, U. R. S.; HEINTZELMAN, D. L.; MAHADEVAN-JANSEN, A.; MALPICA, A.; FOLLEN, M.; RICHARDS-KORTUM, R. Near infrared raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers. **Applied Spectroscopy**. v. 55, n. 8, p. 955-959, 2001.

VALE, A. L. M. **Avaliação do laser de arsenieto de gálio (As-Ga) no processo de reparação muscular do rato.** 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

VAREJÃO, A. S.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; GABRIEL, R. C.; FILIPE, V. M.; MELO-PINTO, P.; WINTER, D. A. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle & Nerve.** v. 26, n. 5, p. 630-635, 2002.

VAREJÃO, A. S.; CABRITA, A. M.; GEUNA, S.; MELO-PINTO, P.; FILIPE, V. M.; GRAMSBERGEN, A.; MEEK, M. F. Toe out angle: a functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. **Exp Neurol.** v. 183, p. 695-699, 2003.

VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia.** São Paulo: Louise, 1993.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry.** v. 69, n. 1, p. 103-113, 2004.

VLAMINGS, R.; VISSER-VANDEWALLE, V.; KOOPMANS, G.; JOOSTEN, E. A.; KOZAN, R.; KAPLAN, S.; STEINBUSCH, H. W.; TEMEL, Y. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves speed of locomotion but impairs forelimb movement in Parkinsonian rats. **Neuroscience.** v. 148, p. 815-823, 2007.

VOMERO, V. U.; MARQUES, M. J.; SANTO-NETO, H. Treatment with an anti-inflammatory drug is detrimental for muscle regeneration at Bothrops jararacussu envenoming: an experimental study. **Toxicon.** v. 54, n. 3, p. 361-363, 2009.

WALKER, J. L.; EVANS, J. M.; MEADE, P.; RESIG, P.; SISKEN, B. F. Gait-stance duration as a measure of injury and recovery in the rat sciatic nerve model. **J Neurosci Methods.** v. 52, p. 47-52, 1994.

WANG, H.; SPINNER, R. J.; SORENSON, E. J.; WINDEBANK, A. J. Measurement of forelimb function by digital video motion analysis in rat nerve transaction models. **J Peripher Nerv Syst.** v. 13, p. 92-102, 2008.

WHELAN, H. T.; SMITS, R. L.; BUCHMANN, E. V., et al. Effects of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v. 19, p. 305-314, 2001.

YAMAMOTO, Y.; KONO, T.; KOTANI, H.; KASAI, S.; MITO, M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. **J Clin Laser Med Surg.** v. 14, p. 129-132, 1996.

YU, H. S.; WU, C. S.; YU, C. L.; KAO, Y. H.; CHIOU, M. H. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. **J. Invest. Dermatol.** v. 120, p. 56-64, 2003.

ZÁDOR, E.; DUX, L.; WUYTACK, F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. **J. Muscle Res Cel Motil.** v. 20, p. 395-402, 1999.

ZAMUNÉR, S. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon.** v. 44, p. 259-271, 2004.

ZHANG, Y.; SONG, S.; FONG, C. C.; CTSANG, C. H.; YANG, Z.; YANG, M. cDNA microarrays analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **J. Invest. Dermatol.** v. 120, p. 849-857, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da análise de função motora dinâmica (*CatWalk*).

TABELA 17 – Dados do grupo Salina (*NaCl* 0,9%) (S).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,11	0,10	-15,54	-14,66	207,39	194,33	0,07	0,07
	0,09	0,11	-12,19	-16,64	181,28	172,56	0,09	0,08
	0,10	0,11	-12,24	-9,79	170,02	175,33	0,07	0,07
	0,20	0,14	-10,00	-11,92	209,03	202,67	0,08	0,09
	0,09	0,08	-15,73	-14,04	187,94	191,22	0,06	0,07
3h	0,08	0,07	-18,98	-22,93	177,50	163,22	0,08	0,08
	0,08	0,08	-16,93	-21,65	164,56	155,78	0,09	0,07
	0,07	0,06	-13,11	-12,57	161,33	174,28	0,07	0,06
	0,09	0,08	-12,43	-13,11	177,44	169,89	0,08	0,08
	0,06	0,07	-18,86	-20,33	143,50	148,56	0,08	0,06
24h	0,06	0,06	-12,59	-22,52	129,17	131,67	0,08	0,08
	0,07	0,09	-12,97	-19,22	99,08	108,44	0,11	0,10
	0,05	0,06	-11,95	-15,01	122,28	114,89	0,08	0,07
	0,07	0,07	-21,50	-21,60	133,00	131,11	0,08	0,08
	0,14	0,13	-15,66	-21,67	127,00	119,11	0,08	0,11
48h	0,07	0,06	-14,36	-23,77	128,67	124,72	0,07	0,09
	0,06	0,07	-24,48	-27,34	156,17	139,11	0,08	0,08
	0,08	0,07	-15,41	-20,52	148,33	146,39	0,06	0,07
	0,08	0,07	-14,57	-19,16	148,03	149,69	0,07	0,08
	0,10	0,09	-23,17	-10,37	135,56	128,83	0,08	0,09
72h	0,06	0,06	-26,13	-27,38	134,83	144,50	0,08	0,07
	0,06	0,08	-2,56	-16,93	127,78	123,11	0,10	0,08
	0,06	0,07	-9,15	-13,57	143,50	131,61	0,08	0,07
	0,06	0,07	-27,04	-21,00	130,67	141,11	0,08	0,07
	0,06	0,06	-14,47	-7,37	126,11	124,67	0,08	0,07

TABELA 18 – Dados do grupo Salina (NaCl 0,9%) (S) – II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	90,18	83,92	6,71	5,83	0,19	0,16	0,07	0,06
	64,31	77,57	6,11	6,28	0,17	0,20	0,07	0,10
	75,79	92,80	5,60	6,32	0,17	0,18	0,06	0,07
	71,03	55,30	5,70	4,99	0,27	0,23	0,10	0,06
	95,76	86,27	5,87	5,99	0,15	0,15	0,07	0,06
3h	107,71	100,25	8,81	8,45	0,16	0,15	0,07	0,06
	94,49	105,44	7,91	7,49	0,17	0,16	0,06	0,07
	116,41	112,28	8,00	7,33	0,13	0,12	0,05	0,06
	84,04	88,17	6,92	6,78	0,16	0,15	0,07	0,08
	93,94	116,71	7,10	7,28	0,13	0,13	0,06	0,07
24h	117,07	121,57	9,07	9,91	0,15	0,14	0,06	0,06
	59,59	74,51	6,52	7,26	0,17	0,19	0,05	0,09
	95,41	102,34	7,61	7,46	0,14	0,13	0,05	0,06
	93,32	89,06	7,40	7,38	0,14	0,15	0,07	0,06
	88,54	87,18	6,62	6,93	0,24	0,24	0,09	0,07
48h	113,48	96,45	8,01	8,68	0,14	0,15	0,07	0,06
	105,34	118,94	8,63	9,01	0,15	0,15	0,06	0,07
	111,25	99,87	6,85	7,03	0,14	0,13	0,07	0,05
	81,65	78,09	5,78	6,26	0,14	0,14	0,07	0,06
	105,71	92,92	6,82	7,36	0,17	0,18	0,07	0,06
72h	121,74	120,63	10,11	8,42	0,15	0,14	0,05	0,05
	83,49	89,19	7,97	7,09	0,15	0,17	0,06	0,08
	95,61	108,91	7,38	7,53	0,14	0,14	0,05	0,06
	88,61	92,15	6,28	6,56	0,13	0,14	0,06	0,07
	98,84	102,71	6,91	7,53	0,13	0,13	0,06	0,06

TABELA 19 – Dados do grupo Salina (NaCl 0,9%) + Laser (SL).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,09	0,09	-11,38	-11,79	162,22	147,83	0,08	0,08
	0,08	0,07	-19,07	-20,02	145,67	137,33	0,07	0,08
	0,13	0,14	-8,21	-4,37	148,72	160,22	0,11	0,09
	0,05	0,07	-16,94	-21,79	139,00	159,56	0,09	0,07
	0,12	0,10	-15,29	-16,64	228,28	220,17	0,08	0,06
3h	0,07	0,07	-14,63	-16,97	124,50	116,72	0,07	0,07
	0,08	0,07	-10,75	-22,95	122,72	127,61	0,12	0,05
	0,07	0,07	-25,94	-14,01	138,00	131,67	0,06	0,06
	0,04	0,05	0,00	-22,03	134,67	138,17	0,07	0,06
	0,10	0,10	-14,57	-15,66	187,66	216,14	0,06	0,06
24h	0,06	0,06	-14,09	-17,14	136,72	138,56	0,08	0,07
	0,11	0,12	-9,55	-12,92	147,06	140,44	0,11	0,10
	0,04	0,04	-11,81	-19,97	132,33	122,44	0,07	0,08
	0,05	0,05	-19,53	-20,77	128,00	127,89	0,07	0,07
	0,10	0,08	-13,28	-21,27	231,56	219,33	0,07	0,09
48h	0,07	0,07	-8,27	-21,18	129,28	133,22	0,07	0,08
	0,06	0,07	-10,14	-23,03	141,00	135,50	0,09	0,08
	0,04	0,04	-30,36	0,00	124,00	115,50	0,07	0,08
	0,06	0,06	-17,54	-22,09	132,72	144,50	0,07	0,07
	0,14	0,13	-8,29	-9,09	226,78	236,69	0,09	0,09
72h	0,09	0,09	-15,76	-11,52	141,94	155,78	0,09	0,07
	0,05	0,05	-18,44	-30,57	166,17	135,33	0,07	0,07
	0,05	0,06	-21,32	-13,60	151,00	137,00	0,08	0,08
	0,06	0,06	-29,49	-19,81	154,22	159,00	0,06	0,07
	0,13	0,13	-10,78	-9,32	219,33	233,86	0,09	0,07

TABELA 20 – Dados do grupo Salina (NaCl 0,9%) + Laser (SL) - II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	94,08	93,97	7,08	7,59	0,16	0,17	0,07	0,06
	88,13	68,75	6,29	5,86	0,15	0,14	0,07	0,06
	61,61	73,40	6,73	6,66	0,24	0,23	0,09	0,11
	92,51	118,42	8,00	8,05	0,13	0,14	0,05	0,06
	94,73	88,50	7,72	6,29	0,20	0,15	0,08	0,06
3h	95,64	96,73	7,03	7,11	0,14	0,14	0,06	0,07
	70,40	82,88	7,78	5,15	0,18	0,14	0,07	0,07
	122,16	119,78	7,79	7,75	0,13	0,14	0,05	0,05
	142,53	156,89	9,94	9,80	0,11	0,12	0,04	0,05
	97,18	115,31	6,60	7,49	0,16	0,16	0,06	0,06
24h	105,90	107,22	7,68	8,01	0,13	0,14	0,05	0,07
	80,79	96,04	7,97	8,31	0,21	0,21	0,08	0,10
	126,79	117,33	8,84	9,16	0,11	0,12	0,04	0,03
	122,07	119,88	8,41	8,34	0,12	0,12	0,05	0,05
	110,93	91,25	7,40	7,32	0,15	0,15	0,07	0,06
48h	119,62	109,60	8,33	8,28	0,14	0,15	0,06	0,05
	104,40	117,53	8,81	8,60	0,14	0,13	0,05	0,06
	142,82	121,65	9,45	9,62	0,11	0,11	0,04	0,04
	104,70	107,44	7,73	7,86	0,14	0,14	0,06	0,06
	74,82	79,81	6,84	6,19	0,23	0,21	0,09	0,08
72h	69,83	104,86	6,15	6,89	0,18	0,17	0,06	0,08
	129,13	132,88	9,39	9,80	0,12	0,12	0,03	0,04
	102,81	99,83	8,07	7,51	0,13	0,14	0,05	0,05
	115,62	115,57	7,44	7,66	0,13	0,13	0,06	0,06
	84,16	77,82	7,25	6,27	0,23	0,21	0,08	0,09

TABELA 21 – Dados do grupo Salina (NaCl 0,9%) + Laser placebo (SLP).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,08	0,10	-19,14	-13,93	226,72	227,50	0,06	0,06
	0,10	0,10	-16,78	-9,76	235,50	237,28	0,07	0,08
	0,10	0,10	-13,13	-16,07	223,83	222,39	0,07	0,07
	0,08	0,08	-21,09	-10,73	216,97	216,28	0,07	0,08
	0,11	0,11	-13,11	-10,56	233,72	233,89	0,07	0,08
3h	0,12	0,12	-11,53	-9,85	225,39	220,94	0,08	0,07
	0,11	0,13	-9,46	-10,88	230,13	229,67	0,07	0,07
	0,06	0,06	-22,94	-22,54	216,83	222,67	0,07	0,06
	0,11	0,11	-16,36	-11,45	237,50	224,56	0,08	0,07
	0,10	0,11	-13,63	-10,66	228,67	230,83	0,07	0,07
24h	0,12	0,12	-10,36	-9,36	225,89	223,83	0,07	0,07
	0,10	0,09	-12,13	-12,02	240,67	238,11	0,07	0,07
	0,10	0,09	-13,04	-14,97	228,67	237,00	0,06	0,07
	0,11	0,12	-14,64	-12,67	242,00	228,83	0,08	0,07
	0,10	0,10	-14,37	-14,32	232,33	238,83	0,06	0,08
48h	0,10	0,10	-14,27	-12,59	235,67	235,00	0,07	0,07
	0,09	0,09	-14,83	-18,90	239,00	236,83	0,07	0,08
	0,10	0,11	-13,85	-13,57	234,17	239,50	0,07	0,06
	0,09	0,09	-17,39	-12,98	244,56	233,33	0,07	0,06
	0,11	0,10	-11,93	-11,71	238,50	214,78	0,07	0,07
72h	0,12	0,12	-18,89	-11,95	236,22	227,33	0,07	0,07
	0,11	0,11	-13,35	-13,84	241,56	237,11	0,06	0,07
	0,11	0,10	-9,55	-13,38	234,67	237,44	0,07	0,06
	0,11	0,12	-16,02	-11,88	239,22	236,78	0,07	0,06
	0,08	0,08	-16,49	-15,20	236,00	242,00	0,08	0,09

TABELA 22 – Dados do grupo Salina (NaCl 0,9%) + Laser placebo (SLP) - II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	89,43	133,30	6,52	8,36	0,13	0,15	0,05	0,07
	118,07	103,42	7,69	7,53	0,17	0,18	0,07	0,06
	112,62	123,62	8,34	8,61	0,16	0,16	0,06	0,07
	118,21	121,36	7,99	8,76	0,15	0,17	0,06	0,05
	115,41	111,18	8,06	8,46	0,18	0,18	0,08	0,07
3h	105,84	105,51	8,03	7,83	0,21	0,20	0,07	0,08
	82,95	102,96	6,30	7,26	0,16	0,20	0,06	0,08
	151,47	147,15	10,57	9,26	0,13	0,12	0,05	0,05
	98,28	101,47	7,46	7,30	0,19	0,18	0,07	0,08
	126,99	121,99	8,86	8,91	0,16	0,18	0,07	0,07
24h	111,61	110,06	8,14	8,03	0,19	0,20	0,07	0,07
	122,25	110,43	8,74	8,22	0,17	0,17	0,07	0,07
	149,52	121,91	8,65	8,89	0,16	0,16	0,07	0,06
	91,60	109,71	7,56	8,00	0,18	0,18	0,07	0,08
	143,64	127,29	9,00	9,48	0,15	0,17	0,07	0,06
48h	113,95	122,56	8,24	8,10	0,18	0,17	0,07	0,07
	124,94	116,47	8,11	8,96	0,15	0,17	0,07	0,06
	115,30	132,76	8,41	8,30	0,18	0,17	0,06	0,07
	106,96	137,33	7,80	8,21	0,16	0,16	0,06	0,07
	133,49	121,28	8,74	7,99	0,17	0,17	0,07	0,07
72h	104,75	120,72	7,81	8,31	0,20	0,19	0,07	0,07
	124,26	122,75	7,96	8,16	0,18	0,18	0,06	0,06
	118,88	120,01	8,17	7,78	0,18	0,16	0,06	0,07
	97,99	119,23	6,75	6,49	0,19	0,19	0,06	0,07
	130,99	104,73	9,95	9,40	0,16	0,20	0,09	0,07

TABELA 23 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) (V).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,06	0,07	-14,75	-12,58	142,00	156,56	0,08	0,08
	0,10	0,09	-24,71	-20,59	130,56	126,89	0,09	0,10
	0,07	0,05	-25,09	-17,82	145,44	124,17	0,07	0,08
	0,09	0,09	-18,55	-20,08	136,56	133,89	0,07	0,07
	0,09	0,09	-11,12	-17,46	128,42	133,56	0,07	0,08
3h	0,09	0,00	-17,55	0,00	149,56	0,00	0,07	0,11
	0,07	0,00	-13,79	0,00	123,53	0,00	0,07	0,00
	0,08	0,00	-13,20	0,00	142,78	0,00	0,06	0,00
	0,08	0,00	-12,08	0,00	151,00	0,00	0,06	0,00
	0,09	0,00	-16,59	0,00	129,61	0,00	0,06	0,12
24h	0,07	0,06	-12,77	0,00	127,17	110,28	0,08	0,09
	0,06	0,04	-19,78	-26,19	148,11	117,94	0,07	0,09
	0,08	0,06	-12,08	-12,60	152,67	121,72	0,07	0,09
	0,07	0,07	-20,15	-18,26	156,83	143,39	0,07	0,08
	0,09	0,07	-11,87	-13,94	162,67	136,36	0,06	0,08
48h	0,08	0,08	-23,65	-19,48	175,06	167,22	0,08	0,08
	0,05	0,05	-24,50	-17,81	144,83	144,67	0,07	0,08
	0,06	0,06	-22,67	-18,51	155,17	144,94	0,08	0,08
	0,07	0,08	-19,07	-15,81	151,78	154,00	0,07	0,07
	0,08	0,08	-24,59	-14,45	156,71	146,67	0,07	0,07
72h	0,09	0,10	-15,48	-8,90	155,00	136,67	0,07	0,10
	0,04	0,05	0,00	-23,61	139,83	132,33	0,09	0,07
	0,05	0,04	0,00	-17,85	154,61	132,78	0,07	0,06
	0,07	0,07	-29,65	-13,42	130,33	140,83	0,07	0,06
	0,08	0,09	-19,65	-8,70	134,33	147,22	0,08	0,08

TABELA 24 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) (V) - II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	105,21	116,09	8,03	9,00	0,14	0,15	0,05	0,05
	96,87	82,09	7,91	8,07	0,19	0,19	0,09	0,08
	124,07	94,42	8,55	7,98	0,14	0,12	0,06	0,05
	106,59	116,34	7,89	7,88	0,16	0,15	0,07	0,07
	83,20	71,11	6,62	5,75	0,17	0,16	0,06	0,07
3h	105,89	66,04	7,35	0,00	0,16	0,00	0,08	0,00
	90,45	0,00	6,38	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
	118,93	0,00	7,40	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00
	124,45	0,00	7,33	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00
	93,99	46,62	5,82	0,00	0,16	0,00	0,09	0,00
24h	89,63	85,58	7,38	8,10	0,14	0,15	0,06	0,06
	122,24	96,30	8,78	9,11	0,14	0,13	0,06	0,04
	84,41	87,65	6,23	8,29	0,18	0,16	0,07	0,07
	107,48	102,59	7,90	8,00	0,14	0,14	0,07	0,06
	125,74	101,76	7,93	7,51	0,14	0,15	0,06	0,05
48h	100,31	97,91	7,83	7,69	0,16	0,16	0,07	0,07
	124,37	106,15	9,07	8,97	0,13	0,14	0,05	0,04
	104,98	100,09	7,82	8,06	0,13	0,14	0,06	0,06
	104,79	105,18	7,34	7,66	0,14	0,16	0,07	0,07
	86,08	92,38	6,13	5,99	0,14	0,15	0,06	0,07
72h	81,70	79,62	5,71	7,66	0,17	0,21	0,08	0,08
	120,46	145,31	10,24	10,55	0,12	0,11	0,01	0,03
	123,29	124,24	9,03	7,66	0,12	0,11	0,05	0,04
	120,24	127,12	7,92	8,10	0,13	0,13	0,06	0,06
	86,01	89,43	6,57	7,60	0,17	0,18	0,05	0,06

TABELA 25 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) + Laser (VL).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,06	0,04	-22,56	-26,47	138,50	110,39	0,08	0,05
	0,05	0,08	-16,71	-18,03	112,03	140,17	0,10	0,08
	0,06	0,07	-35,76	-12,73	146,42	142,44	0,07	0,07
	0,06	0,05	-23,88	-24,41	142,67	135,11	0,08	0,08
	0,10	0,09	-13,25	-11,86	147,44	146,78	0,08	0,10
3h	0,09	0,04	-14,87	-6,64	142,94	96,78	0,08	0,12
	0,11	0,07	-13,59	-13,21	138,81	99,58	0,08	0,14
	0,07	0,03	-14,09	0,00	178,83	95,00	0,05	0,10
	0,07	0,05	-18,49	-5,30	163,22	99,44	0,06	0,08
	0,07	0,01	-18,08	0,00	154,44	64,00	0,06	0,00
24h	0,05	0,04	0,00	-29,83	137,33	122,33	0,06	0,08
	0,08	0,07	-18,53	-18,71	126,67	112,56	0,10	0,11
	0,06	0,09	-19,53	-16,52	139,97	159,94	0,08	0,06
	0,07	0,06	-20,42	-22,37	143,00	121,94	0,08	0,08
	0,07	0,06	-23,78	-18,74	151,78	135,00	0,07	0,09
48h	0,06	0,06	-21,19	-15,31	152,33	139,72	0,07	0,07
	0,06	0,05	-12,11	-19,43	108,78	105,67	0,10	0,11
	0,08	0,07	-30,52	-17,10	168,22	151,44	0,07	0,08
	0,06	0,04	-29,31	-22,28	147,44	135,83	0,07	0,09
	0,08	0,08	-22,25	-16,08	172,78	161,11	0,07	0,08
72h	0,03	0,04	-26,41	-24,85	153,00	169,33	0,11	0,05
	0,07	0,07	-16,26	-17,88	115,06	129,50	0,09	0,10
	0,05	0,06	-11,69	-22,45	174,00	158,00	0,07	0,08
	0,06	0,08	-14,19	-15,31	152,00	145,44	0,08	0,07
	0,08	0,09	-21,83	-21,35	136,39	149,44	0,06	0,07

TABELA 26 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) + Laser (VL) - II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	126,13	135,07	9,42	9,78	0,14	0,13	0,06	0,06
	62,56	98,62	6,52	7,37	0,15	0,16	0,04	0,08
	107,47	120,18	7,38	8,70	0,12	0,14	0,05	0,06
	111,58	111,31	9,38	8,47	0,14	0,13	0,06	0,06
	94,32	75,40	7,39	7,38	0,18	0,18	0,09	0,07
3h	98,50	67,24	7,43	6,60	0,17	0,15	0,08	0,03
	84,86	43,51	6,37	5,82	0,18	0,21	0,12	0,07
	141,55	81,68	7,71	7,96	0,12	0,13	0,07	0,03
	106,01	102,45	6,83	6,00	0,13	0,13	0,06	0,04
	144,90	0,00	8,68	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
24h	179,59	131,96	10,74	10,32	0,11	0,12	0,05	0,03
	69,34	66,78	6,66	6,81	0,17	0,18	0,07	0,06
	73,71	129,76	5,51	6,01	0,14	0,14	0,04	0,07
	102,12	93,03	7,88	7,53	0,15	0,14	0,07	0,06
	98,42	96,92	7,12	8,23	0,13	0,14	0,07	0,05
48h	109,18	155,68	7,62	8,74	0,12	0,13	0,05	0,06
	74,92	65,96	7,11	7,22	0,16	0,17	0,07	0,05
	116,63	100,01	8,08	8,11	0,15	0,15	0,07	0,06
	129,95	107,21	9,69	9,45	0,13	0,13	0,06	0,04
	94,34	84,68	6,72	7,00	0,15	0,18	0,06	0,07
72h	102,48	155,05	11,23	7,72	0,13	0,10	0,02	0,05
	73,45	71,41	6,58	6,81	0,17	0,17	0,07	0,07
	117,14	131,53	8,39	9,57	0,13	0,14	0,05	0,05
	78,59	95,74	6,49	6,63	0,15	0,16	0,05	0,06
	89,31	94,56	6,10	6,64	0,14	0,16	0,06	0,07

TABELA 27 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) + Laser placebo (VLP).

	Apoio (s)		Índice de apoio		Intensidade máxima		Balanço	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	0,09	0,08	-16,00	-14,04	237,17	239,78	0,07	0,06
	0,10	0,07	-11,90	-12,52	221,89	202,69	0,05	0,08
	0,12	0,12	-12,65	-10,97	231,83	219,89	0,06	0,07
	0,08	0,12	-13,22	-15,40	207,42	225,72	0,06	0,06
	0,09	0,08	-15,86	-11,06	191,56	208,17	0,06	0,14
3h	0,08	0,00	-14,82	0,00	233,06	0,00	0,05	0,07
	0,09	0,00	-13,09	0,00	213,00	0,00	0,05	0,00
	0,08	0,00	-17,94	0,00	223,11	0,00	0,06	0,10
	0,14	0,00	-9,90	0,00	225,11	0,00	0,04	0,00
	0,10	0,00	-16,55	0,00	231,78	0,00	0,05	0,03
24h	0,12	0,11	-16,02	-10,62	243,17	241,67	0,07	0,08
	0,06	0,05	-17,95	-18,85	234,00	224,17	0,06	0,06
	0,09	0,08	-12,86	-14,27	238,78	230,56	0,06	0,07
	0,09	0,08	-15,89	-14,20	238,72	226,67	0,05	0,07
	0,06	0,05	-20,80	-16,23	234,61	233,00	0,06	0,06
48h	0,08	0,07	-22,66	-18,42	240,17	235,83	0,05	0,06
	0,08	0,07	-16,43	-19,40	235,50	222,72	0,05	0,07
	0,07	0,07	-18,76	-16,95	221,78	230,33	0,06	0,06
	0,10	0,09	-12,51	-14,21	231,50	231,22	0,07	0,07
	0,06	0,05	-20,87	-19,68	233,17	231,33	0,05	0,07
72h	0,06	0,06	-25,27	-24,29	230,17	235,50	0,07	0,06
	0,07	0,06	-22,58	-22,46	237,00	230,17	0,06	0,06
	0,06	0,07	-16,41	-19,80	239,17	234,50	0,05	0,05
	0,09	0,08	-24,14	-13,63	237,33	234,28	0,06	0,06
	0,05	0,05	-20,48	-19,45	234,17	234,00	0,03	0,05

TABELA 28 – Dados do grupo Veneno (*Bjssu*) + Laser placebo (VLP) - II.

	Velocidade do balanço (cm/s)		Comprimento da passada (cm)		Ciclo do passo (s)		Apoio único (s)	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Pré-lesão	121,90	128,76	8,43	7,09	0,15	0,13	0,05	0,06
	134,90	74,96	7,06	6,08	0,15	0,14	0,07	0,05
	96,86	91,55	6,28	6,25	0,19	0,18	0,06	0,05
	114,51	145,99	7,21	7,82	0,13	0,17	0,05	0,08
	121,33	92,94	7,53	9,86	0,15	0,23	0,07	0,06
3h	141,44	103,37	7,25	0,00	0,13	0,00	0,05	0,00
	141,12	0,00	7,68	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00
	124,20	75,07	7,09	0,00	0,15	0,00	0,08	0,00
	130,06	0,00	5,55	0,00	0,19	0,00	0,12	0,00
	176,74	20,97	8,25	0,00	0,14	0,00	0,10	0,00
24h	109,73	91,64	7,09	7,10	0,19	0,22	0,08	0,07
	174,31	154,83	9,91	9,28	0,13	0,12	0,05	0,05
	131,39	102,39	7,28	7,10	0,14	0,15	0,07	0,06
	147,05	111,42	8,00	8,11	0,15	0,15	0,07	0,05
	149,69	136,84	9,74	8,76	0,12	0,11	0,06	0,04
48h	164,91	147,10	8,65	8,56	0,12	0,13	0,05	0,04
	155,39	125,53	8,23	8,25	0,14	0,13	0,07	0,05
	127,50	121,74	7,56	7,68	0,13	0,13	0,06	0,06
	99,99	97,02	6,80	6,76	0,16	0,16	0,07	0,06
	180,26	139,12	9,53	9,70	0,11	0,14	0,06	0,04
72h	139,60	150,97	9,47	9,03	0,13	0,12	0,06	0,04
	157,31	145,02	9,86	9,43	0,14	0,12	0,06	0,06
	135,28	176,11	7,01	8,44	0,13	0,12	0,03	0,05
	122,00	130,06	7,94	7,84	0,17	0,14	0,06	0,06
	213,49	188,95	6,39	10,03	0,12	0,11	0,03	0,03

ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Influência do LED azul no reparo muscular de gastrocnêmios de camundongos submetidos a lesão com veneno botrópico" (protocolo nº 2950-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling / Prof. Dr. Victor Baranauskas / Willians Fernando Vieira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

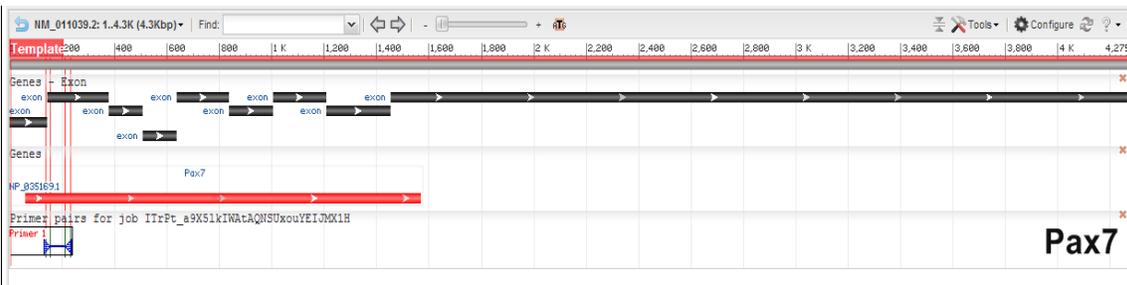
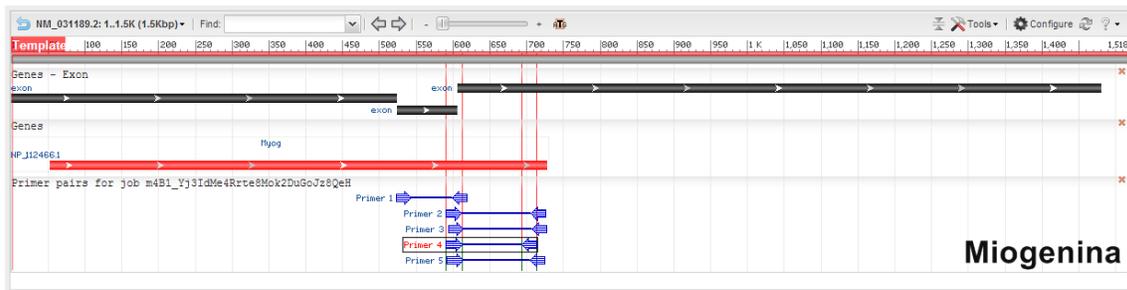
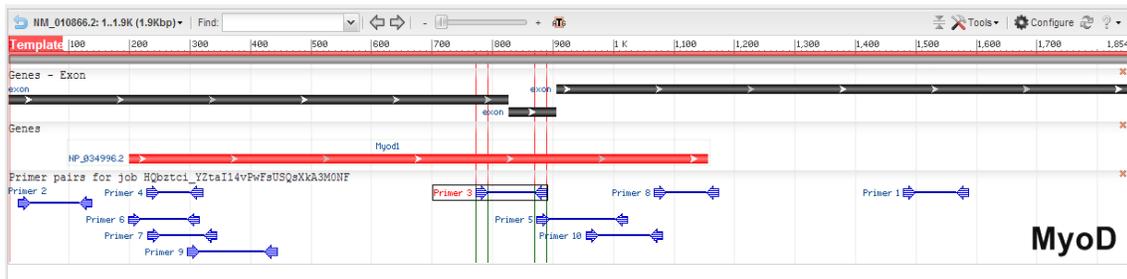
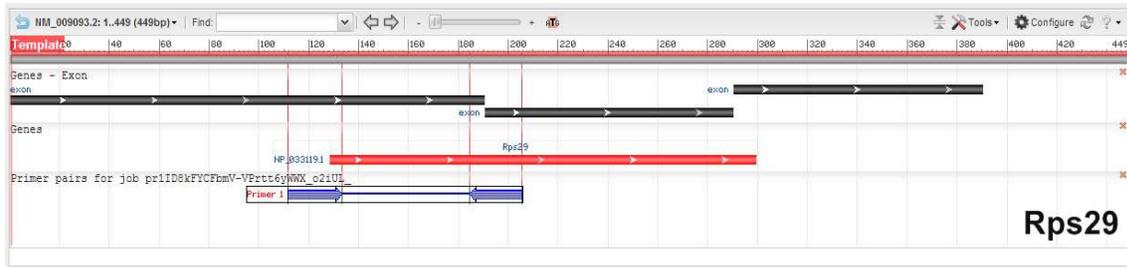
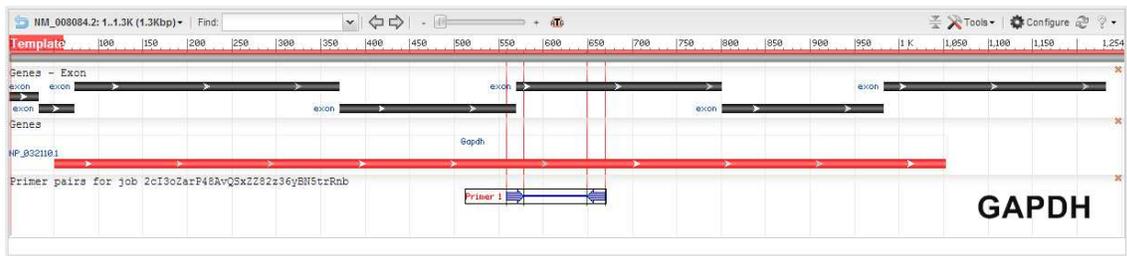
O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 10 de dezembro de 2012.

Campinas, 10 de dezembro de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II – Região de anelamento dos primers em relação ao gene alvo.



16 a 19 de outubro de 2013
Centro de Eventos do Ceará - Fortaleza, CE

**XX FISIOTERAPIA**
Congresso Brasileiro de
ABF • Fortaleza • 2013

Certificado

Melhor Pôster - EDUCAÇÃO E PESQUISA EM FISIOTERAPIA

1º lugar - INFLUÊNCIA DO LASER GAAS NA PATOGÊNESE DO GASTROCNÊMIO APÓS EXPOSIÇÃO AO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU

do(s) autor(es)
WILLIANS FERNANDO VIEIRA; BRUNO KENZO-KAGAWA; MARIA ALICE DA CRUZ-HÖFLING; VITOR BARANAUSKAS

Fortaleza, 19 de outubro de 2013.


Denise Fábio de Carvalho Gotalho Lima
Presidente da ABF


Prof. Dr. Daniel Cardaro Barchiesi MontAlvaine
Presidente do Congresso


Prof. Dr. Wilson Rios Cardoso
Presidente do Conselho Científico



