



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Doroty Mesquita Dourado

**“EFEITOS DA IRRADIAÇÃO POR LASER DE BAIXA POTÊNCIA
SÔBRE A PATOGÊNESE DAS ALTERAÇÕES MIONECRÓTICAS
INDUZIDAS PELO VENENO BRUTO DE *BOTHROPS MOOJENI*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>DOROTY MESQUITA DOURADO</u>
e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>[Assinatura]</u>

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Fevereiro - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D748e

Dourado, Doroty Mesquita

Efeitos da irradiação por laser de baixa potência sobre a patogênese das alterações mionecróticas induzidas pelo veneno bruto de *Bothrops moojeni* / Doroty Mesquita Dourado. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Maria Alice da Cruz-Höfling.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Veneno. 2. Lasers em biologia. 3. *Bothrops*. 4. Terapia a laser de baixa intensidade. I. Cruz-Höfling, Maria Alice da. II. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effects of low-power laser irradiation on the pathogenesis of myonecrotic alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom.

Palavras-chave em inglês: Venom; Lasers in biology; *Bothrops*; Laser therapy, low-level.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Alice da Cruz-Höfling, Maria Julia Marques, José Carlos Cogo, Liana Maria Cardoso Verinaud, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho.

Data da defesa: 17/02/2006.

Campinas, 17 de fevereiro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. José Carlos Cogo


Assinatura

Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho


Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud


Assinatura

Profa. Dra. Maria Julia Marques


Assinatura

Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Assinatura

Profa. Dra. Lea Rodrigues Simioni

Assinatura

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Assinatura

Agradeço à minha família que sempre esteve presente nesta jornada, principalmente meu marido, Geovás e aos meus filhos, André Luiz, Priscila, Luciano e Tatiana e meus queridos netos, Donato e Luiza que são atualmente, donos da minha vida.

Agradeço à Prof^ª. Dr^ª. Maria Alice Cruz Hofling, pela brilhante orientação desta Tese, a amizade, dedicação, sabedoria, profissionalismo e também a confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

À Banca examinadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques, Prof. Dr. José Carlos Cogo, Profa. Dra. Liana M. Cardoso Verinaud, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Prof. Dra. Lea Rodrigues Simioni, Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela distinção em avaliar nosso trabalho.

Aos membros da Pré-Banca: Prof. Dr. José Carlos Cogo, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Prof. Dra. Lea Rodrigues Simioni, pelas sugestões sábias e correções impecáveis.

Aos meus Pais, Celina e Ney que foram diretamente responsáveis pelo início desta jornada, que ora poderá ainda ser apenas mais uma etapa.

À minha irmã Regina, grande amiga, pela assistência e apoio em todos os momentos deste empreendimento.

À Prof^a. MSc. Rosemary Matias, fraterna amiga, por estar sempre ao meu lado durante esta árdua caminhada.

À Prof^a. Dr^a. Maria Julia Marques pelo carinho, bondade e gentil doação ao me acolher em seu laboratório de microscopia Confocal.

Ao Prof. Dr. Paulo Tarso de C. de Carvalho, por ceder o equipamento de laser e pela ajuda na compreensão da luz laser e sua ação nos tecidos.

Aos meus amigos: Vera Lúcia Cardoso, Maria de Fátima Sonati, Delma e Olnei Portela que com denodo e sem buscar gratidão, me ajudaram de forma indelével inesquecível jornada.

As minhas alunas, Josaine, Silmara, Danieli e Dalva pelo carinho e colaboração inequívocos.

À Liliam Panagio, secretária da Pós-Graduação do Instituto de Biologia pela amizade, empenho e responsabilidade em suas funções e que durante o meu Doutorado foi imprescindível.

À Marta Beatriz, responsável pelo Laboratório de Histologia da UNICAMP/IB, amiga e paciente sempre disponível e atenciosa durante o período do Mestrado e Doutorado.

Às minhas amigas Érika e Ângela pela ajuda, amizade, carinho.

À Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) pela total colaboração dispensada durante o período de Doutorado.

À Universidade Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de crescimento profissional e apoio financeiro, sem as quais esta conquista seria assás difícil.

...muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	09
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Gênero Bothrops	14
1.2 Atividades biológicas e constituição química dos venenos botrópicos	15
1.3 Ação coagulante	17
1.4 Ação hemorrágica	17
1.5 Ação miotóxica	19
1.6 Classificação das miotoxinas	20
1.6.1 Pequenas miotoxinas	20
1.6.2 Fosfolipases	21
1.6.3 Cardiotoxinas	24
1.6.4 Variabilidade na composição dos venenos	25
1.7 A espécie <i>B. moojeni</i>	25
1.7.1 Distribuição	27
1.7.2 Toxinologia	28
1.7.3 Aspectos clínicos	29
1.8 Soroterapia	32
1.9 Histórico do laser	34
1.9.1 Aspectos gerais da composição e emissão dos lasers	35
1.9.2 Uso da irradiação laser	37
1.9.3 Laser Helio Neônio (HeNe)	41
1.9.4 Laser Arsenieto de Gálio (AsGA)	41
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
3. OBJETIVOS	68
4. Manuscrito 1	

ACÇÃO DO LASER DE BAIXA POTENCIA USANDO MARCADORES ENZIMÁTICOS
E PROTÉICOS APÓS ENVENENAMENTO BOTRÓPICO NO MÚSCULO

MÚSCULO GASTROCNÊMIO. Doroty Mesquita Dourado, Renato Arruda, Maria Alice da Cruz-Höfling. 79

5. Manuscrito 2

EFFECTS OF LLLT ON *Bothrops moojeni* SNAKE-ENVENOMED GASTROCNEMIUS OF MICE USING ENZYMATIC BIOMARKERS. Doroty Mesquita Dourado, Sílvio Fávero, R Matias, Maria Alice da Cruz-Höfling. 109

6. Manuscrito 3

LOW-ENERGY LASER IRRADIATION ACCELERATES NEOVASCULARIZATION OF MOUSE GASTROCNEMIUS INJECTED WITH *BOTHROPS MOOJENI* SNAKE VENOM. Doroty Mesquita Dourado, Sílvio Fávero, R Matias, Celso Correia de Souza and Maria Alice da Cruz-Höfling. 142

7. ABSTRACT 178

8. Trabalho publicado 181

Dourado, D.M., Fávero, S., Baranauskas, V., da Cruz-Hofling, M.A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops Moojeni* snake venom. **Lasers Surg Med.** 33:352-7, 2003.

RESUMO

O estudo de substâncias naturais visa não só a caracterização dos seus princípios ativos e efeitos biológicos, mas também a compreensão de fenômenos patofisiológicos que muitas vezes são reproduzidos experimentalmente por essas substâncias. Dentre estas, nos países de clima tropical, os venenos ofídicos merecem importância particular pela riqueza de constituintes farmacologicamente ativos e pela frequência dos acidentes causados por picada de serpentes venenosas, particularmente abundantes em países tropicais. No Brasil, esses acidentes adquirem relevância em termos de saúde pública porque podem causar graves alterações sistêmicas e no local da picada, sendo o gênero *Bothrops* responsável por 90% deles. Neste trabalho, as alterações patológicas locais e sistêmicas (mionecrose, edema e hemorragia) induzidas pela injeção intramuscular (i.m.) do veneno de *Bothrops moojeni* (40 µg/mL, 0,1 ml/100 g do peso do animal) em camundogos foram estudadas histologicamente, através da contagem de capilares e pela imunomarcagem do fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF) no músculo gastrocnêmio e pelas alterações nos níveis séricos das enzimas creatino kinase (CK), fosfatase ácida (AcPase), fosfatase alcalina (AlkPase), desidrogenase láctica (LDH), transaminase oxalo-acética (AST) e da proteína mioglobina ao longo de 3, 12, 24 horas, 3, 7 e 21 dias (n = 5/período) após o envenenamento. Os efeitos de protocolos de irradiação por lasers de baixa potência, HeNe (632,8 nm) e o diodo AsGa (904 nm), ambos com densidade de energia de 4 J/cm², sobre esses parâmetros foram avaliados. A primeira sessão de irradiação foi administrada logo após a injeção i.m. do veneno e depois a cada 24 h, de forma que o número de irradiações feito foi uma, uma, duas, 4, 8 e 22, respectivamente, incididas perpendicularmente no local da injeção por 120 s (HeNe) e 18,3 s (GaAs) de duração de cada sessão. Para as dosagens de LDH, AST e mioglobina o tempo zero, sem irradiação foi acrescentado. Os resultados foram comparados com animais controles, injetados com solução salina estéril (0,9%). Morfologicamente, o veneno produziu imediata série de alterações, a qualidade das quais mostrou-se semelhante das 3 às 24 h (pós-injeção) p.i., porém com aumento do número de células mionecróticas e de infiltrado inflamatório. A fase regenerativa iniciada 3 d p.i., mostrou crescente número de fibras em regeneração, decrescente número de fibras

degeneradas e substituição de polimorfos nucleares por população de macrófagos. Histologicamente, a irradiação pelo HeNe atenuou as alterações iniciais (3 h), porém a do AsGa foi mais efetiva em longo prazo (21 d), induzindo ao maior número de miotubos e à melhor citoarquitetura do tecido. A contagem do número de vasos sangüíneos no local e vizinhanças da lesão, mostrou que o grupo tratado com veneno e não irradiado com laser de baixa energia teve diminuição do número médio de capilares na área afetada, e que a irradiação laser acelerou a neovascularização, sendo o HeNe mais eficaz do que o AsGa. Os resultados também mostraram que o VEGF e seus receptores foram expressos em parte dos neutrófilos, em esparsas células satélites nos períodos iniciais do envenenamento (3 – 24 h), nos capilares das áreas periféricas à lesão, e nos interstícios de fibras em degeneração. A irradiação com HeNe induziu o aparecimento desse marcador nos polimorfonucleares, mas o AsGa aboliu a positividade a eles. O HeNe promoveu a expressão de VEGF nos capilares dos tendões e nas células musculares intactas. Aos 7 d p.i., na região das fibras regenerativas a irradiação com HeNe levou ao aparecimento de positividade em células do interstício semelhantes a fibroblastos, além de marcação em células “satélites” de miotubos em formação. A irradiação por ambos os lasers induziu também o aparecimento de VEGF positivo nos fibroblastos do tendão que atravessava o músculo, nas camadas média e adventícia de pequenas artérias e veias e nos fusos neuromusculares, além do interstício dos ramos nervosos intramusculares, principalmente nos períodos de 7 e 21 dias. Os resultados da análise das enzimas mostraram que a irradiação pelo laser HeNe reduziu marcadamente a atividade de CK de 3 h até 7 dias, enquanto o laser AsGa de 12 h até 21 dias p.i. A atividade da AcPase aumentou dramaticamente às 12 h p.i., após o que houve um declínio que foi mais acentuado com o laser AsGa. A irradiação com o laser HeNe induziu aumento gradual da atividade de AlkPase até 24 h e então diminuiu-a, ao passo que o laser AsGa causou um extraordinário aumento entre 12 h e 24 h, mantendo diferença significativa em relação ao grupo veneno de camundongos não irradiados. A irradiação com HeNe não foi eficaz em diminuir os níveis de LDH, ao invés foi prejudicial elevando os seus níveis em diferentes momentos. Já a irradiação com AsGa foi eficaz em diminuir significativamente os níveis da enzima ao longo de todos os períodos observados. Com relação a AST, a irradiação com HeNe foi eficaz em diminuir os níveis da enzima apenas às 3 h p.i., após o

que teve efeitos deletérios. Por outro lado, a irradiação com AsGa não foi eficaz em diminuir os níveis de AST, exceto aos 7 dias, quando houve redução significativa de 16,6%. Os níveis elevados de mioglobina sérica causados pelo veneno de *B. moojeni*, foram diminuídos significativamente com o laser AsGa das 12 h p.i. até os 7 d, ao passo que o HeNe só mostrou eficácia dos 3 aos 7 d p.i. O grupo de camundongos injetados com solução salina não mostrou nenhuma diferença significativa em todos os tempos analisados para esses parâmetros. Concluímos que a terapia laser de baixa energia, arsenieto de Gálio aplicada localmente é capaz de alterar o conteúdo sérico de biomarcadores de dano da fibra muscular (CK e mioglobina), como também de marcadores de alterações sistêmicas, como o laser HeNe foi eficaz para aumentar a quantidade de vasos sanguíneos no tecido lesado. A fotoestimulação promovida pela irradiação com laser de baixa energia pode alterar favoravelmente indicadores de alterações locais e sistêmicas causadas por envenenamento por *Bothrops moojeni*, apontando esse recurso como promissor na recuperação do músculo afetado e nos distúrbios sistêmicos advindos.

Palavras-chave: *B. moojeni*, CK, enzimas séricas, morfometria, VEGF, irradiação por laser

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a região Centro-Oeste apresenta anualmente um índice elevado de acidentes ofídicos. A ocorrência desses acidentes está possivelmente, relacionada a fatores climáticos e à atividade humana nos trabalhos de campo.

As condições ambientais de países tropicais como o Brasil são favoráveis ao sucesso na adaptação e sobrevivência dos animais peçonhentos o que se constitui em fator responsável pela existência de inúmeras espécies desses animais.

No Estado de Mato Grosso do Sul, a maioria dos acidentes ofídicos registrados deve-se a serpentes que pertencem aos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Os dados estatísticos fornecidos pelo CIVITOX (Centro Integrado de Vigilância Toxicológica - Campo Grande – MS) no ano de 2005 registram que foram atendidos 131 pacientes que sofreram acidentes ofídicos por serpentes peçonhentas. Os acidentes ofídicos costumam ocorrer na região pantaneira nos meses de verão (novembro a março), que são os mais quentes do ano, no Estado.

O atendimento aos acidentados não ocorre de imediato devido ao fato de a população pantaneira encontrar-se distante (150 a 200 km) do local de atendimento médico sanitário, que é a cidade de Campo Grande. Em casos de acidentes ofídicos, o uso local de torniquete, fumo macerado, café, esterco, sangria é muitas vezes praticado pela população leiga. Esses procedimentos de primeiros socorros, utilizados pela população rural (dados do CIVITOX (2005) indicam que a faixa etária está entre 20 a 49 anos; nenhum óbito e os meses de maior índice de acidente ofídico são: março, abril e novembro), além de serem inadequados, podem potencializar os efeitos tóxicos e causar infecção, por contribuírem com uma concentração local do veneno pelo torniquete, ou por agentes potencialmente infecciosos aplicados topicamente no sítio da picada e adjacências afetadas.

De acordo com o CIVITOX, os critérios utilizados nos centros de atendimento são baseados nos sinais clínicos apresentados pelo paciente, os quais permitem, em alguns casos, a identificação da serpente, tendo em vista que é pouco freqüente que o paciente, ou a família, tragam a serpente que causou o acidente. Após a identificação da serpente, o paciente é investigado quanto ao tempo de coagulação da amostra de seu sangue, procedimento este já sob internação hospitalar. Os técnicos do CIVITOX informaram que

quando o paciente apresenta dor intensa com edema acentuado, o acidente possivelmente foi provocado por serpentes do gênero *Bothrops*, e quando os sintomas locais são mais brandos, por *Crotalus*.

O veneno das serpentes é produzido por um par de glândulas exócrinas especializadas, que são glândulas salivares modificadas, situadas na boca. A secreção produzida por essas glândulas é constituída por uma complexa mistura de moléculas, de natureza química diversa, que apresenta diferentes ações, tanto no homem quanto nas presas que são utilizados pelas serpentes como alimento (Tu, 1977; Jiménez-Porras, 1964).

A posição e estrutura dos dentes inoculadores de peçonha (presas) constitui uma das principais características taxonômicas distintivas de Elapidae e Viperidae. Existe uma relação direta entre o número de acidentes ofídicos e as características da dentição e a eficiência na inoculação do veneno. Tais características permitem a classificação dessas serpentes em Solenóglifas, Proteróglifas, Opistóglifas e Áglifas. As principais características distintivas da família Viperidae são: 1) fosseta loreal, 2) cabeça triangular recoberta com escamas pequenas, 3) dentes inoculadores de veneno (presas) grandes, ponteagudos, móveis e ocos, situados na frente da boca (solenoglifodontes), 4) parte superior do corpo recoberta por escamas sem brilho, em forma de quilha, e 5) cauda diferenciada para cada gênero da família, ou seja, cauda lisa, com guizo ou chocalho ou cauda com escamas arrepiadas no final (Brasil. Ministério da Saúde, 1991).

As serpentes Solenóglifas apresentam o aparelho inoculador do veneno mais eficiente em relação às outras serpentes e possuem as presas anteriores mais desenvolvidas e com grande mobilidade, e um canal central que se comunica pela base com o ducto excretor da glândula de veneno (Goin; Goin, 1971). Dessa forma, a inoculação do veneno em suas vítimas, ou presas, é muito eficiente em relação à velocidade e quantidade de veneno injetado, e, portanto, com efeitos mais severos, causando um grande número de acidentes. As articulações frouxas entre os ossos da cabeça destas serpentes e a extrema mobilidade dos mesmos, devido a músculos cranianos apropriados, possibilitam o direcionamento das presas para frente, em posição de ataque, permitindo que a serpente possa ferir e injetar o veneno enquanto sua boca permanece aberta formando um ângulo de aproximadamente 90 graus. Um sistema do tipo seringa é assim formado, o qual, junto com

longas presas, permite uma penetração profunda e a eficiente injeção do veneno (cf. Kochva, 1987).

1.1 Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* (ordem Squamata, família Viperidae) é constituído por várias espécies de serpentes que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (Hoge; Romano-Hoge, 1972). Este gênero está representado por aproximadamente 32 espécies que se distribuem por todo o Brasil. As principais espécies brasileiras do gênero *Bothrops* são: *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. leucurus*, *B. neuwiedi*, *B. insularis*, dentre outras. Algumas espécies são de maior importância por sua extensa distribuição geográfica como, por exemplo, a *B. atrox* na Amazônia, *B. erythromelas* no Nordeste, *B. moojeni* no Centro-Oeste e Sudeste, *B. jararaca* na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

No Estado de São Paulo, nos casos em que houve a identificação da serpente causadora do acidente as serpentes do gênero *Bothrops* foram responsáveis por 83,3% dos 4.685 casos notificados à São Paulo. Secretaria de Saúde (1993), entre os anos de 1986 a 1988. De acordo com a WHO. Organização Mundial da Saúde (OMS-1981), em algumas regiões brasileiras, a mortalidade tem sido estimada em 2,4% e, pode até mesmo ser mais alta que 8%, quando o indivíduo vitimado não recebe tratamento com o antiveneno adequado.

O gênero *Bothrops* é de grande importância médica, científica e social, pelo fato de ser responsável por 90% do total de acidentes ofídicos notificados Brasil. Ministério da Saúde, 1991; Rosenfeld, 1971; Ribeiro et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Barraviera; Pereira, 1994).

Essas serpentes apresentam cauda lisa, hábito noturno e são consideradas muito agressivas. Habitam de preferência locais úmidos, como matas e áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de ração) e as zonas rurais e periféricas das grandes cidades. Os nomes utilizados pela população para identificar essas serpentes são: “jararaca”, “jararaca-do-rabo-branco” (nome atribuído ao filhote), “jararacussu”,

“cotiara”, “urutu” e outros. Destas serpentes, a “jararaca” é a responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no sudoeste do Brasil (Brasil. Ministério da Saúde, 1991; Barraviera; Pereira, 1994).

1.2 Atividades biológicas e constituição química dos venenos botrópicos

Os venenos ofídicos são compostos por uma mistura complexa de componentes protéicos (enzimáticos e não enzimáticos) e não-protéicos (orgânicos e inorgânicos), que podem variar na composição e toxicidade de acordo com a origem geográfica (Chippaux, et al., 1991; Cardoso et al., 1993).

A peçonha botrópica é, provavelmente, de composição mais complexa dentre as de outros gêneros. Contém vinte ou mais componentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. Os componentes enzimáticos são as fosfolipases, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases e enzimas proteolíticas (Bieber, 1979; Bjarnason; Fox, 1994).

O componente não protéico do veneno botrópico é pouco expressivo em quantidade e menos ativo biologicamente, porém desempenha importante papel coadjuvante na ação enzimática. Dentre os componentes não protéicos encontram-se substâncias inorgânicas e orgânicas

Dentre os constituintes inorgânicos estão os metais, que são cátions e ânions, e estes tem o papel de neutralizar as cargas dos constituintes protéicos do veneno, especialmente os cátions monovalentes, nos quais o sódio está presente em maior quantidade. Estes íons monovalentes não têm grande significado em termos biológicos nas atividades enzimáticas. No entanto, alguns metais bivalentes atuam como co-fatores para diferentes atividades biológicas e enzimáticas e na constituição de metaloproteínas. A fração dos metais varia de um veneno para outro, mas os que geralmente são encontrados são: cálcio, zinco, magnésio, sódio, potássio, cobre, ferro e níquel. O cálcio é um metal bivalente que se encontra em quantidades moderadas nos venenos ofídicos e parte deste é utilizado para a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) (Hidalgo, 1999).

Os constituintes orgânicos são classificados em aminoácidos livres e pequenos peptídeos, nucleotídeos e compostos relacionados, como: carboidratos, lipídios e aminas biogênicas (Hidalgo, 1999).

Dentre os constituintes orgânicos encontrados no veneno botrópico está a bradicinina, uma amina biogênica responsável pela dor no local da picada (Barraviera; Pereira, 1994).

O veneno das espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* tem efeito predominantemente proteolítico, coagulante, hemorrágico, inflamatório, edematogênico e miotóxico (Da Silva et al., 1979; Furtado et al., 1991; São Paulo. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 1993; Souza et al., 2001; Teibler et al., 2001; Monteiro et. al, 2002). Verificou-se através de técnicas bioquímicas de separação, que cerca de 70 proteínas, com ou sem ação enzimática, e peptídeos, podem ser detectados em um único veneno (Perkins et al., 1993) e com ampla variação de ações farmacológicas e tóxicas.

Os sinais clínicos exibidos pelo envenenamento botrópico são decorrentes dos diversos componentes que já foram isolados dessas secreções, tais como o fator hemorrágico (Mandelbaum et al., 1984), proteases que atuam em etapas da coagulação sanguínea causando distúrbios de coagulação (Hofmann; Bon, 1987), enzimas proteolíticas (Assakura et al., 1985) e as miotoxinas (Gutiérrez; Cerdas, 1984; Gutiérrez; Lomonte, 1989; Homsí-Branderburgo et al., 1988; Moura-da-Silva et al., 1991b; Fuly et al., 2003). Dentre as principais proteínas enzimáticas com atividade miotóxica encontradas nos venenos ofídicos, estão as enzimas proteolíticas e as fosfolipases.

Os estudos das peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* estão direcionados para a compreensão dos efeitos que causam no local da picada, que incluem dor intensa, imediata e local, proeminente necrose tecidual, edema, além de efeitos sistêmicos, como distúrbios da coagulação, hemorragia e inflamação, que podem repercutir em efeitos fisiopatológicos em outros sistemas biológicos (Rosenfeld, 1971; Mebs; Ownby, 1990). De acordo com a gravidade do acidente e as medidas de primeiros socorros adotadas, os efeitos no local da picada podem determinar perda de tecido ou amputação do membro afetado (Rosenfeld, 1971; Brazil, V., 1982). A administração do soro-antiofídico neutraliza em parte os efeitos sistêmicos da peçonha, no entanto, a neutralização dos efeitos locais é

extremamente dificultada pela imediata atuação de toxinas ativas presentes no veneno (Homma; Tu, 1971; Rosenfeld, 1971).

1.3 Ação coagulante

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possui substâncias capazes de induzir o sistema de ativação da coagulação, pela ação sobre o fibrinogênio, protrombina e pela ativação do fator X sobre as plaquetas que, conseqüentemente, resultam em alterações na coagulação sanguínea (Nahas et al., 1979; Burdmann et al., 1993).

Esta ação envolve a atividade coagulante do tipo trombina, caracterizada pela transformação direta do fibrinogênio em fibrina, e a ação de outras proteases que atuam em pontos específicos da cascata de coagulação. Os venenos têm a capacidade de ativar o fator X, e quando isso ocorre, há também o consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando à produção de quadro de coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de microtrombos na rede capilar (Nahas et al., 1979), o que contribui para desencadear a insuficiência renal aguda (IRA) (Amaral et al., 1986; Araújo et al., 2001; Cardoso et al., 1993).

A ação coagulante, juntamente com a hemorrágica, influi na evolução da atividade inflamatória. A atividade coagulante desencadeia a formação de trombos na microvasculatura, com conseqüente hipóxia, agravamento do edema, e necrose tecidual.

1.4 Ação hemorrágica

A ação hemorrágica do veneno botrópico é atribuída a componentes específicos, denominados hemorraginas, que são metaloproteinases e representam cerca de 1% do veneno total, e são distintas das frações coagulantes (Gutiérrez; Rucavado, 2000; Rodrigues et al., 2001). Os sinais clínicos dessa ação, no local da picada, estão ilustrados na Figura 1.



Figura 1 – Ação hemorrágica.

Estas hemorraginas contém zinco na sua composição e a perda deste metal (Zn^{+2}) pode acarretar a inativação desta enzima (Mandelbaum; Assakura, 1984; Gutiérrez; Lomonte, 1989; Cardoso et al., 1993).

As hemorraginas podem romper a integridade do endotélio vascular pelo fato de terem atividade de desintegrina, e dessa forma degradam vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina. Além disso, são potentes inibidoras da agregação plaquetária, e apresentam como possíveis mecanismos de ação, a digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e a ruptura completa das células endoteliais ou formação de *gaps*. As clivagens específicas das hemorraginas em pontos-chave desencadeiam mecanismos endógenos amplificadores, sendo que, atualmente, há clara evidência de ataque proteolítico à lâmina basal vascular (Cardoso et al., 1993).

A atividade hemorrágica amplia o quadro inflamatório, particularmente na região da picada, através da lesão do endotélio vascular e da atividade sobre o fator de necrose tumoral (FNT) pré-formado, que libera citocinas ativas, e ambos propiciam o extravasamento de líquidos para o espaço intersticial, constituindo o flictema (Figura 2) (Schvartsman, 1992; Cardoso et al., 1993).



Figura 2 – Ação proteolítica

1.5 Ação miotóxica

De acordo com Mebs e Ownby (1990), a miotoxidade é uma ação direta e específica do veneno sobre o músculo esquelético, causada por substâncias denominadas miotoxinas, levando à degeneração e morte celular (mionecrose). As miotoxinas, por terem uma ação direta, diferenciam-se de outros componentes tóxicos, como as hemorraginas, que podem, indiretamente destruir o músculo esquelético e outros tecidos. Pela característica de atuarem especificamente no músculo esquelético, uma miotoxina verdadeira, não destroem terminais nervosos, células satélites, vasos sanguíneos ou tecidos conjuntivo. As miotoxinas estão amplamente distribuídas nos venenos das serpentes (Mebs et al., 1983).

Após a picada da serpente, o primeiro tecido a ser afetado no acidente ofídico é a pele e a musculatura, o que pode levar a uma marcante diminuição da função ou, até, amputação do membro afetado (Rosenfeld, 1971). Os processos miolíticos severos, em geral vêm acompanhados por edema e hemorragia resultantes da ação combinada dos fatores contidos no veneno, mascarando o efeito específico atribuído à cada um dos componentes do veneno (Homma; Tu, 1971; Ownby, et al., 1982; Gutiérrez et al., 1984; Mebs; Ownby, 1990).

As miotoxinas dos venenos das serpentes constituem um grupo heterogêneo de toxinas (Mebs; Ownby, 1990), que atuam primariamente no tecido muscular, causando mionecrose. Esta é de difícil distinção da mionecrose secundária, causada, por exemplo, por isquemia do tecido causado pela falência da microcirculação afetada pelas hemorraginas (Queiroz, et al., 1985), que direta ou indiretamente atuam nas células endoteliais. Por outro lado, existem venenos como o da *Bitis arietans* (Mebs; Panholzer, 1982), que não causam lesões nas células musculares, muito embora contenham algumas das mais ativas hemorraginas.

Alguns pesquisadores dividem as miotoxinas em dois ou mais grupos e que de acordo com Mebs; Ownby (1990) essas miotoxinas podem ser divididas em dois grupos principais: a) pequenas miotoxinas e b) miotoxinas fosfolipásicas, além disso, Harris; Cullen (1990) incluíram um terceiro grupo, c) as cardiotoxinas.

1.6 Classificação das miotoxinas

1.6.1 Pequenas miotoxinas

As pequenas miotoxinas são peptídios básicos, com ponto isoelétrico acima de 9 (Fox, 1979), massa molecular em torno de 4.000 daltons, 42-45 a.a. e nenhuma atividade enzimática. Como exemplos deste grupo, a crotamina, do veneno de *Crotalus durissus terificus* (Brazil, V., 1982), a miotoxina *a* do veneno de *Crotalus viridis viridis* (Ownby et al., 1976; Cameron; Tu, 1977), o peptídeo *c* do veneno da *Crotalus viridis helleri* (Maeda et al., 1978), miotoxina I e II do veneno de *Crotalus viridis concolor* (Engle et al., 1983; Bieber et al., 1987), toxina III do veneno de *Crotalus horridus horridus* (Mebs et al., 1983) e toxina CAM do veneno de *Crotalus adamanteus* (Samejima et al., 1988). Essas miotoxinas não exibem atividade enzimática. A crotamina e a miotoxina *a*, atuam nos canais de sódio promovendo maior influxo desse íon nas células musculares, sem afetar a integridade do sarcolema, observações feitas em preparações de músculo esquelético de ratos e camundongos (Chang; Tseng, 1978; Hong; Chang, 1985), no entanto, alteram o equilíbrio hidroeletrolítico celular, com dilatação das cisternas do retículo sarcoplasmático e prejuízo da função a enzima Na^+K^+ -ATPase.

Estudos realizados com microscopia eletrônica demonstram que a vacuolização vista no citoplasma das fibras musculares após ação das miotoxinas pequenas que atuam em canais de sódio, ocorre em consequência da dilatação do retículo sarcoplasmático e do espaço perinuclear, mas não dos túbulos T, evidenciando manutenção da integridade da membrana plasmática. Observou-se, também, que outras células, como fibroblastos e células endoteliais, não são afetadas por essas miotoxinas quando injetadas no organismo (Mebs; Ownby, 1990).

1.6.2 Fosfolipases

As fosfolipases representam uma grande família de enzimas que apresentam como uma das principais propriedades químicas, a hemólise, ou seja, a capacidade de produzir a hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular dos eritrócitos seguidos do rompimento dos glóbulos vermelhos. Assim as fosfolipases A_2 (PLA_2) são enzimas chaves na regulação e produção de segundo mensageiros lipídicos e outros metabólitos que participam no metabolismo de lipídios, reações imunes, reestruturação da membrana e reparação de tecidos, proliferação celular, transdução de sinal, etc. De acordo com a ação hemolítica, as PLA_2 podem se agrupar em: (1) as que produzem uma ação hemolítica direta e (2) as que produzem uma ação hemolítica indireta. Neste último caso estão as das PLA_2 que se encontram nos venenos das serpentes da família Viperidae. Denomina-se atividade hemolítica indireta porque requer lecitina externa, como a proveniente do plasma sanguíneo ou de outra fonte, para produzir lisolecitina, a qual atua sobre a membrana dos eritrócitos produzindo lise. As fosfolipases de ação direta não necessitam da lecitina externa para promover a hemólise, e não se tem registro de sua existência nos venenos das serpentes da família Viperidae (Hidalgo, 1999).

Como exemplos de fosfolipases com atividade fosfolipásica A_2 (PLA_2) e neurotóxica estão: a notexina do veneno de *Notechis scutatus scutatus* (Harris et al., 1975), a crotoxina do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (Gopalakrishnakone et al., 1984), a taipoxina do veneno de *Oyuranus scutellatus* (Harris; Maltin, 1982) e a toxina mojave do veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* (Cate; Bieber, 1978). A crotoxina e a taipoxina

são toxinas constituídas por duas, três ou mais diferentes cadeias de polipeptídeos, não-covalentemente ligados.

As alterações patológicas produzidas por essas miotoxinas nas células musculares caracterizam-se por hipercontração dos miofilamentos levando à agregação das miofibrilas, acompanhada por despolarização e necrose da célula. O mecanismo proposto para explicar essas alterações tem sido o de que haveria hidrólise dos fosfolipídios da membrana devido à atividade enzimática, ruptura do sarcolema e perda da habilidade da célula em regular o fluxo de cálcio extracelular (Harris; Macdonell, 1981; Gutiérrez et al., 1984), o que levaria às alterações patológicas observadas. Mitocôndrias também mostram sinais de danos, como o intumescimento, cristas anormais, densidades floculantes e ruptura. Algumas enzimas, tais como a creatino kinase (CK) são rapidamente liberadas das fibras necróticas. O processo degenerativo é acompanhado por edema tecidual e infiltração de células fagocitárias. Aproximadamente, entre 12 e 24 horas após a inoculação do veneno, as fibras musculares encontram-se totalmente destruídas com aparência amorfa e hialina.

As miotoxinas com e sem atividade PLA_2 causam as mesmas alterações nas fibras musculares como descritas nas miotoxinas com atividade fosfolipásica A_2 (PLA_2) e neurotóxica, porém não causam sintomas neurotóxicos. Provocam intenso processo de mioglobínúria, com conseqüente falência renal, responsável pelo efeito letal em camundongos (Fohlman; Eaker, 1977). Dentre as proteínas dos venenos com atividade miotóxica estão as fosfolipases A_2 (PLA_2) (E.C.3.1.1.4.) e as PLA_2 – “like” (Van Deenen et al., 1988).

A miotoxina não-neurotóxica é composta por um grupo grande de enzimas que podem ser encontradas principalmente em serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae. A ausência de neurotoxicidade é observada na baixa atividade letal, neste caso, ligada à mioglobínúria e falência renal (Mebs; Ownby, 1990).

Várias espécies de Bothrops possuem esse grupo de miotoxina (Gutiérrez et al., 1984; 1986; 1991; Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Gutiérrez; Lomonte, 1989; Heluany et al., 1992).

Apesar das alterações morfológicas provocadas pela miotoxinas não-neurotóxicas serem semelhantes às encontradas nas neurotóxicas, contudo existem duas diferenças que podem ser inferidas e que indicam que as miotoxinas não-neurotóxicas utilizam

mecanismos diferentes quanto à miotoxidade, ou seja, algumas miotoxinas deste grupo são citotóxicas às células imaturas musculares. Este processo foi observado em estudos com células *in vitro* (Brusés et al., 1993; Bultrón et al., 1993b).

As PLA₂s compreendem uma família de hidrolases esterolíticas que catalizam a hidrólise de fosfoglicerídeos 3-sn na posição 2, gerando ácidos graxos livres.

As fosfolipases dos venenos ofídicos estão usualmente distribuídas em dois grandes grupos animais. O grupo I inclui as famílias Elapidae e Hydrophidae e o grupo II, inclui as Crotalidae e Viperidae.

As miotoxinas PLA₂ que estão largamente distribuídas em muitos venenos de serpentes e de acordo com sua estrutura, podem ser divididas em dois grupos distintos: a) enzimas cataliticamente ativas – PLA₂ – Asp-49 que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 da cadeia de aminoácidos, o qual é o sítio de ligação do íon cálcio, e está relacionada com a elevada atividade enzimática e incluem a miotoxina I do veneno de *B. asper* (Gutiérrez et al., 1984) e as miotoxinas dos venenos de *N. nigricollis*, *N. haje haje* e *N. nivea* (Mebs, 1986) e b) enzimas que apresentam pouca ou nenhuma atividade enzimática, PLA₂ – Lys-49 ou PLA₂-like”, que possuem um resíduo lisina na posição 49 e possuem baixa ou nenhuma atividade fosfolipolítica, embora estudos bioquímicos e imunológicos tenham indicado que elas são estruturalmente análogas às PLA₂ (Karlsson, 1979; Howard; Gundersen, 1980; Díaz et al., 1991; Selistre de Araújo et al. 1996) e onde estão incluídas a bothropstoxina I de *B. jararacussu* (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Rodrigues-Simioni et al., 1995), a miotoxina do veneno de *B. nummifer* (Gutiérrez et al., 1986), e a IV (Díaz et al., 1995) do veneno de *B. asper*, a miotoxina I e II de *B. asper* (Lomonte et al., 1990) e a miotoxina II de *B. godmani* (Díaz et al., 1992). Do veneno de *B. pirajai* foi isolada uma miotoxina, a qual foi denominada Piratoxina-I (PrTX-I) e caracterizada como miotoxina do tipo PLA₂-Lys-49, ou seja, com baixa atividade PLA₂ e apresentou o mesmo número de resíduos de aminoácidos (121) da bothropstoxin-I de *B. jararacussu* (Mancuso et al., 1995).

Estudos realizados por Ownby e Colberg (1988) sobre as diferentes etapas da mionecrose em experimentos com venenos de *Crotalus viridis viridis*, *Naja naja naja* e *Crotalus atrox* mostraram que estas etapas se manifestam em quatro períodos: fase inicial (15 min a 3 horas), fase intermediária (3 a 72 horas), fase tardia (72 a 96 horas) e fase final

(após 96 horas). O início do processo caracteriza-se pelas chamadas lesões “delta” (Mokri; Engel, 1975), que são lesões das fibras musculares em forma triangular originada por lise focal da membrana plasmática.

Além disso, há o aparecimento de vacúolos claros, miofibrilas em diferentes graus de condensação, intercaladas com áreas claras irregulares, de aparência amorfa no citoplasma (o que levou pesquisadores estrangeiros a usar a expressão “moth-eaten lesions” por assemelharem-se essas regiões da fibra como se tivessem sido comidas por traças). Em uma fase intermediária, durante a patogênese do processo mionecrótico predominam pelo menos dois estágios patológicos caracterizados por miofibrilas condensadas, que assemelham-se às da fase inicial, e por células com aparência amorfa, e, em uma terceira fase, a presença de intenso infiltrado de células fagocíticas, e na fase final, áreas de células musculares pequenas, em fase de regeneração, intercaladas com áreas de tecido fibrótico.

1.6.3 Cardiotoxinas

São miotoxinas, também denominadas citotoxinas. São proteínas básicas de baixa massa molecular (6.000 a 7.000 daltons), desprovidas de atividade enzimática e possuem de 60 a 62 resíduos de aminoácidos interligados por 4 pontes de dissulfeto. Apresentam várias ações em diferentes tipos de células: causam hemólise e despolarização e contração das células musculares esqueléticas (Lin Shiau et al., 1976; Flechter; Lizzo, 1987), com conseqüente mionecrose. Estas cardiotoxinas foram originalmente assim chamadas por sua ação *in vivo* no coração, causando arritmias (Condrea, 1974).

As possíveis formas de ação para as cardiotoxinas incluem: 1) ação direta sobre a membrana plasmática, provocando ruptura da mesma, acompanhada por despolarização, 2) ação indireta através da ativação da fosfolipase C endógena do tecido, ou 3) uma combinação dos dois mecanismos; 4) outra possibilidade seria através da inibição da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ seguida por aumento da concentração osmótica de Na^+ e edema celular por influxo de água para a célula (Ownby et al., 1993). As alterações causadas pelas cardiotoxinas assemelham-se às causadas pelas pequenas miotoxinas que atuam em canais de Na^+ .

1.6.4 Variabilidade na composição dos venenos

Para uma mesma espécie, a composição do veneno pode variar em função de pelo menos três fatores: 1) Idade do animal: tem sido demonstrado que o veneno de filhotes de *B. jararaca* e *B. moojeni* possui maior atividade pró-coagulante (ativação de fator X e protrombina) e menor atividade proteolítica em relação às serpentes adultas (Méier, 1986; Chippaux et al., 1991; Furtado et al., 1991); 2) Distribuição geográfica e condições climáticas e ambientais: serpentes de mesma espécie coletadas em ambientes diferentes podem apresentar variações na atividade dos venenos (Glenn et al., 1983; Minton; Weinstein, 1986; Chippaux et al., 1991). Williams e Write (1992) descreveram grandes alterações na composição do veneno de uma única espécie de *Pseudonaja textilis* mantida sob condições de variações de sazonalidade durante um ano e, 3) Caráter individual: constatada pela presença de diferentes frações diversas em veneno de serpentes de mesma procedência. Entre as diferentes espécies de *Bothrops*, esta variabilidade também é observada, apesar de ser ainda limitado o conhecimento das diferenças na atividade dos venenos das várias espécies existentes no Brasil.

Embora os venenos das serpentes botrópicas brasileiras apresentem as três ações básicas (proteolítica, coagulante e hemorrágica), experimentalmente, foram identificadas frações com atividades específicas e com diferentes graus de potência para determinados ofídios (Chippaux, et al., 1991).

1.7 A espécie *Bothrops moojeni*

A espécie *B. moojeni* (Fig. 3) que foi classificada por Hoge (1965), pertence à família Viperidae, sub família Crotalinae (Amaral, 1978). Ela recebeu este nome em homenagem ao pesquisador mineiro João Moojen, que realizou diversos estudos sobre serpentes na região de Brasília. Esta espécie, típica do Distrito Federal, é a maior serpente peçonhenta do Planalto Central (Sebben et al., 1996).

Esta serpente, conhecida popularmente como caíçaca, baetão ou jararacão, possui hábito terrestre e geralmente está em atividade durante o período noturno (Amaral, 1978). Seus principais alimentos, quando adulta, são pequenos roedores e anfíbios, e quando filhote, anfíbios e pequenos lagartos (Carvalho; Nogueira, 1998). Esta mudança

ontogenética no hábito alimentar parece ser acompanhada pela mudança na composição da peçonha: Os acidentes ofídicos causados por filhotes desta espécie parecem produzir sintomas de intensidades diferentes, em relação aos causados por serpentes adultas (Kouyoumdjian; Polizelli, 1989; Ribeiro; Jorge, 1990). A espécie *B. moojeni* adulta pode ultrapassar 1,5 metros de comprimento. Sua pele é de aspecto marron aveludado com desenhos bem nítidos (Fig. 3), e seu comportamento é agressivo, podendo dar botes sucessivos projetando praticamente todo o corpo, e não apenas o terço inicial como, em geral, ocorre em outros ofídios, o que dificulta sua captura com laço ou gancho.

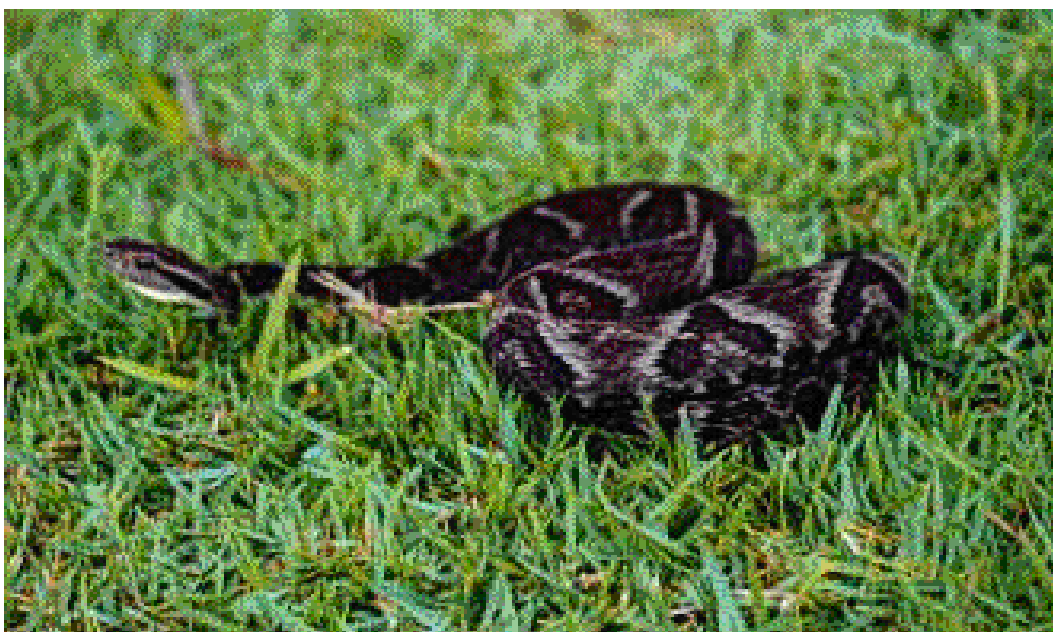


Figura 3. *Bothrops moojeni* em vista geral. Note o padrão de manchas característico da espécie (foto cedida pela Profª. MSc. Ieda Novaes Ilha.)



Figura 4 – Distribuição geográfica da serpente *Bothrops moojeni* no Brasil. Fonte: FUNASA - outubro/2001 - pág. 17. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p

1.7.1 Distribuição

É uma espécie de hábitos terrestres, vivendo em áreas abertas de regiões mais quentes e secas, sendo encontrada em parte no Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil (Fig. 4).

A serpente *B. moojeni* é uma espécie com larga distribuição nas regiões de cerrado do Brasil, desde o sul dos estados de Maranhão e Piauí, passando pela região leste de Tocantins e Goiás, oeste de Minas Gerais, centro-oeste e oeste dos estados de São Paulo e Paraná, até o Mato Grosso do Sul, nordeste do Paraguai e extremo norte da Argentina, sendo encontrada até 1.500 m acima do nível do mar (Campbell; Lamar, 1989). A *B. moojeni* pode ser encontrada em regiões urbanas (Carvalho; Nogueira, 1998) e, em algumas áreas da sua distribuição, como no noroeste do estado de São Paulo (São José do Rio Preto) e Triângulo Mineiro e é considerada a principal espécie implicada em acidentes ofídicos (Kouyoumdjian et al., 1990; Nishioka; Silveira, 1992).

1.7.2 Toxinologia

Em comum com outras espécies do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. moojeni* possui alta atividade proteolítica associada com uma baixa ação hemorrágica (Hoge, 1965; Hoge; Romano-Hoge, 1972) que contém uma variedade de enzimas, tais como L-amino ácido oxidase, fosfatase alcalina, fosfodiesterase, fosfolipase, hialuronidase, 5'-nucleotidase, peptidases, e (metalo)proteases (Assakura et al., 1985; Aird; da Silva, 1991; Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Leite et al., 1992; Gasparello-Clemente; Silveira, 2002), bem como um inibidor de trombina (Castro et al., 1999). Destes componentes, os mais bem caracterizados bioquímica e farmacologicamente são: 1) a batroxobina, uma enzima tipo trombina (Stocker et al., 1982; Lochnit; Geyer, 1995), também encontrada na peçonha de *B. atrox* (Petretski et al., 2000), e 2) uma variedade de proteases, que inclui serinoproteases, algumas com atividade sobre a agregação plaquetária (Serrano et al., 1993; Oliveira et al., 1999), e metaloproteinases (Assakura et al., 1985; Mandelbaum; Assakura, 1988; Assakura; Mandelbaum, 1990; Reichl; Mandelbaum, 1993; Reichl et al., 1993; Serrano et al., 1993; Ho et al., 2002), e 3) fosfolipases ácidas (Reichl et al., 1989; Nonato et al., 2001) e básicas (miotoxinas I e II) (Lomonte et al., 1990, 1991; Díaz et al., 1991; Moura-da-Silva et al., 1991a,b; Soares et al., 1998, 2000).

Várias destas enzimas contribuem para as atividades edematogênica, miotóxica, hemorrágica, letal, e necrotizante da peçonha de *B. moojeni*, bem como à sua ação sobre a cascata de coagulação, agregação plaquetária e função renal (Zingali et al., 1988; Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Leite et al., 1992; Sanchez et al., 1992; Francischetti et al., 1998; Ruiz de Torrent et al., 1999; de Roodt et al., 2000), e também a atividade microbicida (Tempone et al., 2001). Vários estudos têm mostrado que a letalidade da peçonha de *B. moojeni* é menor que a de outras *Bothrops* (Dias-da-Silva et al., 1989; Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Sanchez et al., 1992), embora isso pareça depender em parte da via de administração (Sanchez et al., 1992). De modo semelhante, a peçonha de *B. moojeni* é a menos hemorrágica entre diversas espécies de *Bothrops* (Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Sanchez et al., 1992; de Roodt et al., 2000).

Muitas das atividades enzimáticas e biológicas da peçonha são neutralizadas por antisoro equino comercial (Moura-da-Silva et al., 1990; Ferreira et al., 1992; de Roodt et al., 1997, 1998a), e também por extratos aquosos da planta *Casearia sylvestris* (Borges et al., 2000, 2001), e por soro do gambá *Didelphis albiventris* (Soares et al., 1997). A soroterapia é eficaz no tratamento de envenenamento por esta espécie (Kouyoumdjian; Polizelli, 1989).

1.7.3 Aspectos clínicos

A sintomatologia do envenenamento por *B. moojeni* é muito semelhante àquela observada com outras *Bothrops* (Rosenfeld, 1971; Watt, 1989; Jorge; Ribeiro, 1990; Fan; Cardoso, 1995; Ribeiro; Jorge, 1997; Brasil. Ministério da Saúde, 1998), e inclui efeitos locais (edema, hemorragia e necrose) e sistêmicos (principalmente coagulopatia, com pouca ou nenhuma hemorragia sistêmica) (Kouyoumdjian; Polizelli, 1989). Apesar de estudos clínicos ainda não terem relatado problemas de insuficiência renal em acidentes por *B. moojeni*, como ocorre com outras espécies botrópicas (Amaral et al., 1986), investigações experimentais já demonstraram que a peçonha de *B. moojeni* causa dano histológico e disfunção renal em ratos (Boer-Lima et al., 1999, 2002; Barbosa et al., 2002) e em células epiteliais renais em cultura (Collares-Buzato et al., 2002). Este dano é parecido àquele causado pela peçonha de *B. jararaca* em ratos (Rezende et al., 1989) e cães (Burdmann et al., 1993), e pode ser mediado em parte por uma das miotoxinas da peçonha (Barbosa et al., 2002).

De Roodt et al. (1998) relataram um dimorfismo sexual para *B. moojeni* onde as fêmeas são, em média, duas vezes mais pesadas que os machos, e que esta diferença é refletidas na quantidade maior de peçonha obtida de fêmeas, comparadas aos machos (médias de 294 -153 mg/espécime, respectivamente). Esta diferença entre os sexos persiste quando a quantidade de veneno é expressa por 100 g de peso corporal (46,5 mg/100 g e 56,3 mg/100 g para machos e fêmeas, respectivamente). A relevância clínica desta diferença, ou seja, acidentes envolvendo serpentes fêmeas, poderiam ser mais graves que os envolvendo machos, ainda não foi investigada para esta espécie, embora Kouyoumdjian; Polizelli (1989) tenham relatado que o envenenamento por serpentes grandes (≥ 80 cm)

pode resultar em maiores efeitos locais e uma tendência para menos distúrbios de coagulação, quando comparado a serpentes menores (≤ 53 cm).

Resultados semelhantes também já foram relatados para *B. jararaca* (Ribeiro; Jorge, 1990). Estas observações são corroboradas pela ocorrência de variações ontogenéticas no rendimento, mas não no conteúdo protéico ou na letalidade de peçonha entre espécimes recém nascidas e adultas. Semelhantemente, não há diferença na atividade amidolítica entre estes dois grupos, enquanto que os recém nascidos têm menos atividade proteolítica, fibrinolítica e ativação dos fatores II e X, porém mais atividade coagulante que exemplares adultos (Furtado et al., 1991).

Em acordo com isso, vários estudos já mostraram que a atividade miotóxica da peçonha de *B. moojeni* está relacionada à presença de pelo menos duas miotoxinas fosfolipásicas (MOO-I e II, miotoxinas I e II ou Bmtx-I e Bmtx-II), as quais produzem edema e necrose em camundongos (Lomonte et al., 1990; Moura-da-Silva et al., 1991a; Soares et al., 1998, 2000). Estas miotoxinas aparentemente não afetam a coagulabilidade sangüínea (Lomonte et al., 1990). A identidade imunológica destas miotoxinas com proteínas correlatas de outras peçonhas botrópicas já foi demonstrada em estudos de neutralização por antisoro (Lomonte et al., 1990, 1991; Moura-da-Silva et al., 1991a).

Ao contrário da ação miotóxica, a atividade hemorrágica da peçonha de *B. moojeni* tem sido menos estudada. A atividade da peçonha é mais que 10 vezes menor nesta espécie do que em outras *Bothrops* (Assakura et al., 1985; Furtado et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Leite et al., 1992; Sanchez et al., 1992; Ruiz de Torrent et al., 1999; de Roodt et al., 2000) e, apesar de várias enzimas proteolíticas já terem sido isoladas e caracterizadas da peçonha de *B. moojeni* (Assakura et al., 1985; Mandelbaum; Assakura, 1988; Assakura; Mandelbaum, 1990; Reichl; Mandelbaum, 1993; Reichl et al., 1993; Serrano et al., 1993; Oliveira et al., 1999), apenas uma destas, a *moojeni* protease a (Assakura et al., 1985; Mandelbaum; Assakura, 1988), demonstra atividade hemorrágica; as outras proteases são serinoproteases sem atividade hemorrágica. A atividade hemorrágica da *moojeni* protease a, é menor que a da peçonha e é bem fraca quando comparada a fatores hemorrágicos (hemorraginas) isoladas das peçonhas de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* (Mandelbaum; Assakura, 1988), motivo pelo qual ela é classificada como uma protease com atividade hemorrágica e não como uma hemorragina propriamente dita.

Estes achados indicam que a *moojeni* protease a não é responsável por toda a atividade hemorrágica da peçonha de *B. moojeni*. Esta conclusão é apoiada pelo fato de que: 1) as peçonhas botrópicas frequentemente possuem mais que uma hemorragina (Gutiérrez; Rucavado, 2000). Assakura et al. (1985), no trabalho em que isolaram e caracterizaram a *moojeni* protease a, mostraram que havia dois picos de atividade hemorrágica no perfil de eluição da peçonha após gel filtração (a *moojeni* protease a correspondia ao pico menos ativo), achado este corroborado por Leite et al. (1992), que também notara dois picos hemorrágicos ao fracionarem a peçonha de *B. moojeni* por FPLC em coluna Mono-Q e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, e 3) a comparação imunológica entre fatores hemorrágicos isolados das peçonhas de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* e a *moojeni* protease a, mostra que esta possui pouca identidade imunológica com hemorraginas das outras peçonhas (Mandelbaum; Assakura, 1988).

Brazil e Vellard (1928), consideraram o veneno de *B. moojeni* (na época denominada como *Lachesis atrox*), como o de ação proteolítica mais intensa entre os botrópicos. Além disso, foi considerado o veneno com maior atividade coagulante entre as espécies brasileiras até então estudadas. A atividade proteolítica deste veneno é duas vezes maior que a dos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, embora a ação hemorrágica seja dez e duzentas vezes, respectivamente menor que as destes venenos. Esses autores também verificaram que o veneno de *B. moojeni* tem baixas atividades hemorrágicas, comparadas à dos venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* (Assakura et al., 1985).

Ruiz et. al. (1999), estudaram a atividade hemorrágica, edematizante, proteolítica e hemolítica indireta (*in vitro*) do veneno de *B. moojeni* da Argentina, além da mionecrose e regeneração das fibras musculares. Observaram que a atividade mionecrótica foi intensa a partir de 1 hora com predomínio de lesões musculares do tipo necrose coagulativa e em 3 horas infiltrado inflamatório de polimorfonucleares com predomínio de neutrófilos e a partir de 48 horas apareceram os macrófagos. A recuperação das lesões foi parcial, com fibras musculares de menor diâmetro em relação às fibras normais. Concluíram que as lesões causadas pelo veneno de *B. moojeni* são intensas, e que, pela recuperação parcial das mesmas, pode gerar perda de tecido, com seqüelas funcionais.

O veneno de *B. moojeni* possui uma alta atividade proteolítica associada a uma baixa ação hemorrágica. Este veneno tem alta atividade coagulante e de fosfolipase A₂ (Reichl et al., 1989; Furtado et al., 1991).

1.8 Soroterapia

A soroterapia consiste de uma aplicação prática de conhecimento sobre imunidade passiva artificialmente adquirida (Guidolin, 1989). Esta imunização é adquirida pela transferência de anticorpos de um indivíduo sensibilizado, o doador, para outro indivíduo, o receptor. A soroterapia é homóloga quando ambos os doadores e receptores pertencem a mesma espécie animal, e heteróloga quando eles pertencem a espécies diferentes (Guidolin, 1989).

A soroterapia tem sido o procedimento mais efetivo no tratamento da picada de serpente (Brasil. Ministério da Saúde, 1998) e seus princípios foram baseados nos estudos pioneiros de dois pesquisadores, o francês Albert Calmette e o brasileiro Vital Brazil (Rosenfeld, 1969; Brazil, V. 1987; Schvartsman, 1992).

No Brasil os primeiros soros antiofídicos foram preparados pelo médico Brazil, V. em 1905, contra o veneno de Bothrops, *Lachesis lanceolatus* (hoje classificada como *Bothrops jararaca*) e contra o veneno de Crotalus, *Crotalus terrificus* (hoje, *Crotalus durissus terrificus*) (Schvartsman, 1992). Inicialmente, Brazil, V. demonstrou a especificidade do antiveneno (1901), e após ele começou a preparar os antivenenos mono e polivalentes no Brasil. O antiveneno monovalente incluía o soro anticrotálico e antibotrópico e Vital Brazil foi considerado o criador da soroterapia heteróloga com o desenvolvimento de uma terapia efetiva para vítimas de acidentes ofídicos (Ihering, 1911; Rosenfeld, 1969; Bücherl, 1980; Guidolin, 1989; Watt, 1989).

O antiveneno é uma solução purificada de imunoglobulinas específicas, obtidas do soro de equínos hiperimunizados com venenos de serpentes ou aracnídeos e escorpiões. No Brasil, a produção de antivenenos é feita pelo Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e Fundação Ezequiel Dias (MG), sendo distribuído para todo o país pelo Ministério da Saúde (Schvartsman, 1992; Camey et al., 2002).

A maioria dos antivenenos (AV) comerciais do Brasil é de origem equina e a imunização é feita com venenos de várias espécies de serpentes de mesmo gênero, ou de diferentes gêneros, de maneira a aumentar o espectro de neutralização do anti-soro (Russell, 1988). A neutralização de venenos de espécies diferentes daquelas usadas na imunização pode ocorrer devido à reatividade antigênica cruzada. Realmente, os venenos podem estar relacionados entre si, farmacológica e/ou estruturalmente, o que permite a conseqüente neutralização por AV heterólogo (Ménez, 1985).

A soroterapia AV, quando indicada, é passo fundamental no tratamento adequado dos pacientes picados pela maioria dos animais peçonhentos. A dose utilizada deve ser a mesma para adultos e crianças, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno circulante, independentemente do peso do paciente. A aplicação deve ser feita, preferencialmente, na unidade de emergência ou de internação (Brasil. Manual de Vigilância Epidemiológica, 1993).

Entretanto, a soroterapia heteróloga, embora sendo a única abordagem terapêutica geralmente usada nos acidentes ofídicos, pode acarretar reações adversas, como reações anafiláticas, anafilatóides e a doença do soro, além disso, os pacientes podem apresentar febre, artralgia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, urticária e proteinúria. A patogenia da doença deve-se à formação do complexo imune AV/veneno, com ativação e consumo de complemento (Malasit et al., 1986; Jurkovich et al., 1988; Cardoso et al., 1993; Brasil. Manual de Vigilância Epidemiológica, 1993; Dart; Horowitz, 1996; Otero-Patiño et al., 1998).

De acordo com Battellino et al. (2003), a administração intravenosa do antiveneno botrópico (AvB) neutraliza os efeitos sistêmicos, mas não efetivamente reverte o sintoma local produzido pelo veneno de *B. jararaca* (VBj) e, os mecanismos envolvidos nesta falta de proteção, não têm sido bem esclarecidos. Estes pesquisadores demonstraram que a administração de AvB 15 min antes e 15 min após a aplicação do VBj reverte totalmente os sintomas locais, que geralmente são representados por distúrbios da coagulação, desenvolvimento de lesões hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular e incremento na interação de leucócitos com o endotélio.

Já Camey et al. (2002), estudaram o efeito farmacológico de venenos de 5 espécies botrópicas brasileiras em relação à sua letalidade, atividade hemorrágica, necrotizante,

proteolítica da fosfolipase, coagulante e fibrinolítica. Analisaram também *in vitro* e *in vivo* a eficácia de um antiveneno produzido a partir de um “pool” desses venenos em neutralizar a atividade tóxica e enzimática dos mesmos. Os resultados indicaram que o antiveneno foi altamente efetivo na neutralização sistêmica da atividade tóxica de todos os venenos testados. Além disso, foi verificado que o antiveneno preparado na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) contra veneno botrópico é efetivo para neutralizar os principais efeitos tóxicos do veneno de Bothrops. Porém os efeitos locais ainda não são neutralizados pelo uso dos antivenenos.

Entretanto, qualquer que seja a abordagem terapêutica até hoje disponível, tem-se mostrado ineficaz na neutralização dos efeitos locais produzidos pela picada e liberação do veneno no sítio, as quais são de evolução rápida e intensa.

Por esses motivos, a procura por abordagens alternativas às usualmente empregadas, tem sido motivo de interesse e se constituem em medidas extremamente relevantes para a neutralização e/ou diminuição dos efeitos degenerativos, bem como para a aceleração dos processos regenerativos. No Brasil, tem sido crescente o interesse em investigar terapias coadjuvantes à soroterapia e já existe, embora que ainda incipientes estudos que combinam o seu uso à aplicação de extratos de plantas medicinais. Outra possibilidade que começa a ser implementada é a utilização da laserterapia.

1.9 Histórico do Laser

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser foi bastante tardia em comparação com outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área remontam à segunda metade da década de 80. Posteriormente, trabalhos na área foram publicados por Silveira e Lopes (1991) em Belo Horizonte, Genovese (2000) em São Paulo e Pinheiro e colaboradores, inicialmente na Inglaterra e posteriormente em Recife (Brugnera Jr; Pinheiro, 1998).

Os princípios da emissão estimulada de radiação foram propostos por Einstein (1917), no entanto só a partir da Segunda Guerra Mundial que o uso do radar possibilitou o domínio da interação radiação matéria, originando o projeto de Gordon; Zeiger; Townes,

(1955), denominado MASER (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou Amplificação de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação).

Schawlow e Townes (1958), estenderam os princípios de emissão estimulada da cadeia de microondas para as regiões dos raios infravermelhos e da luz visível do espectro eletromagnético.

A primeira fonte a emitir a luz Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation - Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação) foi relatada por Maiman (1960), que, a partir da excitação de um cristal de rubi por intermédio de um flash fotográfico, produziu a emissão estimulada na faixa visível do espectro.

Patel (1964), criou o laser de dióxido de carbono (CO_2) situado na área do infravermelho no espectro eletromagnético. Simultaneamente, pesquisadores como McGuff et al. (1965), utilizavam o laser de rubi para a destruição de tumores malignos em animais.

O laser de hélio-neônio (HeNe) surgiu logo após o lançamento do laser de rubi e consistiu na mistura dos gases hélio e neônio como fonte de emissão da luz laser.

1.9.1 Aspectos Gerais da Composição e Emissão dos Lasers

A luz laser possui características singulares, quando comparada a outra fonte de luz, pois tanto a coerência espacial como a temporal conferem a essa luz a propriedade especial de concentrar em um único ponto uma alta quantidade de energia.

Se um fóton ou uma partícula energética de luz é direcionado em um átomo, pode ser absorvido, refletido ou transmitido. Se a partícula é refletida ou transmitida não há mudança na energia luminosa (Micholovitz, 1996).

Quando um fóton de um determinado comprimento de onda entra no campo eletromagnético de um átomo excitado, esse fóton desencadeia a mudança do elétron excitado para um nível de menor energia, em direção ao núcleo do átomo. A liberação de energia armazenada se dá sob a forma de um segundo fóton e assim sucessivamente esses dois fótons desencadeiam a liberação de mais dois fótons, e os quatro desencadeiam oito e assim por diante, de modo que, num espaço pequeno, na velocidade da luz, essa cadeia de fótons produz a emissão de uma luz rápida, intensa, monocromática e coerente (Miserendino; Pick, 1995).

O laser é também uma luz intensamente brilhante, podendo ser tão brilhante como o sol, além de ser uma forma de radiação não ionizante (Goldman, 1991).

A luz laser pode variar dentro do espectro eletromagnético do infravermelho ao RX.

Segundo Goldman et al. (1965), todos os lasers são compostos de quatro componentes primários: o meio ativo; uma cavidade ressonante que envolve o meio ativo e permite que ocorra a excitação; uma fonte de energia que funciona como ativadora do mecanismo de excitação; uma fonte de energia que funciona como ativadora do mecanismo de excitação e cria uma população inversa; e um sistema de liberação que pode se dar através de fibras ópticas ou espelhos articulados.

As características que diferem a luz laser de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência (Schawlow, 1995).

A coerência é uma das propriedades da luz laser que ao penetrar no tecido, se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido á grande variedade de estruturas celulares que compõem a pele (Mickiley et al., 1988; Haczeki et al., 1989). De acordo com esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do laser de baixa potencia (LBP) no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (Svaasand, 1990).

Além disso, a luz produzida por um laser é monocromática, e a maior parte de radiação emitida pelo aparelho de uso terapêutico agrupa-se em torno de um único comprimento de onda, com uma amplitude muito limitada de faixa de onda. Em contraste, a luz gerada por outras fontes é formada por uma enorme variedade de comprimento de onda, algumas vezes variando desde o ultravioleta até o infravermelho, o que resulta na sensação da cor branca, quando a luz colide com a retina de um observador humano. O comprimento de onda é um fator relevante na determinação dos efeitos terapêuticos específicos produzidos pelos tratamentos por laser, pois este parâmetro determina qual biomolécula específica absorverá a radiação incidente (Baxter, 1998). Outro parâmetro relevante é a dose e a intensidade da luz utilizada na irradiação (Fedoseyeva et al., 1988).

Na luz de um laser, os fótons produzidos pelo aparelho são, para todas as finalidades práticas, compostas de feixes paralelos, praticamente inexistindo qualquer divergência da radiação emitida por toda a distância percorrida pelo laser. Esta propriedade mantém a

potência óptica enfeixada em uma área relativamente pequena ao longo de distâncias consideráveis, propriedade a que se dá o nome de colimação (Low; Red, 2001).

A luz emitida pelos aparelhos de laser também está em fase, e assim, conjuntamente com a monocromaticidade e a colimação seu pico e depressões encaixam-se perfeitamente no tempo e no espaço (Baxter, 1998).

1.9.2 Uso de irradiação Laser

As graves alterações locais causadas por venenos botrópicos nos tecidos afetados dos membros inferiores e superiores por ocasião de acidentes de envenenamento ofídico, e que são de difícil resolução, é o motivo de se procurarem novas alternativas para serem implementadas em combinação com o uso de antivenenos. Dentre elas, a fotoestimulação dos processos biológicos regenerativos, pós-envenenamento, apresenta-se como uma proposta atraente. A fotoestimulação pode ser alcançada por irradiação com laser de baixa energia. A diferença entre este tipo de laser e o laser de alta potência é que o último se dá através da ativação de sistemas termo-sensíveis, e é utilizada em geral na prática cirúrgica.

Os parâmetros que descrevem o laser são o tipo e o comprimento de onda, a potência média e a potência pico ou potência radiante, a área irradiada e o tipo (forma) do feixe, o qual pode ser contínuo ou pulsado (Kitchen; Partridge, 1991; Tuner; Hode, 1999).

O princípio do laser fundamenta-se na estimulação de um elétron ou uma molécula, que sofre um salto quântico quando previamente estimulado, passando de um baixo a um alto estado de energia, passando a emitir ondas na mesma frequência, comprimento de onda e direção, originando o feixe laser que possui mais potência que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (Kitchen; Partridge, 1991).

A irradiação por laser de baixa energia, tem sido utilizado para modular vários processos em diferentes sistemas biológicos (Belkin et al., 1988; Karu, 1989). O efeito biológico relacionado ao comprimento de onda da luz emitida pelo laser tem sido demonstrado em vários estudos. Hoje, os comprimentos de onda mais comumente usados para propósitos terapêuticos são de 632.8 nm para o laser Hélio-Neônio (HeNe), 635 nm, 650 nm, 660 nm, 670 nm por meio do laser Arseniato de Gálio e Alumínio(AsAlGa) e 904 nm para o laser Arseniato de Gálio (GaAs) e 10.600 nm para o laser de Dióxido de Carbono

(CO₂). Exceto para o laser GaAs e CO₂, todos os lasers produzem feixe de luz contínua (http://www.laser.nu/lllt/LLLT_critic).

O laser terapêutico apresenta a propriedade de produzir efeitos biológicos em nível celular, promovendo a estimulação seletiva das mitocôndrias, provocando aumento no metabolismo celular, aumentando a atividade dos fibroblastos, auxiliando na recomposição tecidual, além de produzir efeito analgésico pelo aumento do limiar das terminações nervosas livres. Este laser também pode promover a estimulação dos sistemas imunitários, ocorrendo melhora na defesa do organismo, diminuição do edema e diminuição da dor do pós-operatório (Goldman, 1991; Silveira; Lopes, 1991; Tatarunas et al., 1998; Mello; Mello, 2001).

Ortiz et al. (2001), mostraram resultados a respeito dos efeitos biomodulativos que acontecem sobre os efeitos com fluências superiores a 10 J/cm². A fagocitose de leucócitos foi consideravelmente aumentada por uma densidade de energia incidente de 0,05 J/cm² e inibida utilizando-se dose de 2 a 4 J/cm².

Kana et al. (1981), compararam os lasers de Argônio (514,5 nm) e HeNe (632,8 nm) e observaram aceleração na cicatrização entre os 3º e 12º dias de pós-operatório com o uso do laser HeNe (4 J/cm²). Esta aceleração da cicatrização foi em decorrência do aumento da síntese de colágeno e fibroplasia.

Também em 1981, apareceu pela primeira vez o relato da aplicação clínica de um diodo laser de As-Ga-Al, publicado por Calderhead, do Japão, que comparava a atenuação de dor promovida por um laser diodo e laser de Nd:YAG (yttrio e alumínio dopado com neodímio), operando em 1064 nm.

O mais importante efeito do laser de baixa potência sobre a cicatrização de feridas (Mester et al., 1973) tem sido por conta do aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos. Porém os efeitos do laser de baixa potência observados fora da área tratada, foram atribuídos por Mester (1974) e Trelles et al (1983) a fatores humorais. Mediante esse importante postulado, os autores preconizaram que durante o tratamento, não seria necessário irradiar toda a área lesada para obter um efeito uniforme em toda a zona. Baseados nessa teoria, Rodrigo et al., em 1985, publicaram um estudo sobre o efeito do laser de HeNe no tratamento de fístulas osteomielíticas múltiplas de ratos fêmeas, onde obtiveram a cura de todas elas no corpo, irradiando apenas uma única pata do animal.

Bihari e Mester (1989) apresentaram um estudo clínico também, em pacientes portadores de úlceras vasculares em que os pacientes foram divididos em grupos. Um grupo foi irradiado com laser de HeNe, outro com a associação de laser de HeNe e um laser diodo emitindo na região do infravermelho próximo ($\lambda=904\text{nm}$) constituído de um cristal de Arsenieto de Gálio (As-Ga), por apresentar maior penetração no tecido biológico este dispositivo pode operar de forma contínua ou pulsada e o outro laser, com uma luz não-coerente cujo comprimento de onda era de 632 nm (modo contínuo). Em todos os grupos a fluência utilizada foi de 4 J/cm^2 . Os autores demonstraram a eficácia terapêutica da associação dos diferentes tipos de lasers, que demonstraram melhores resultados quando comparados aos demais grupos.

Tsuchida et al. (1991) trataram feridas cirúrgicas de ratos normais e diabéticos irradiados com laser de HeNe com varredura e com fluência de 4 J/cm^2 . O estudo foi delineado para observar o seguimento da velocidade de fechamento das feridas e foi comprovado que as feridas tratadas com laser fecharam antes, tanto nos animais normais, como nos diabéticos, quando comparados a seus respectivos grupos controles, não irradiados.

Terribile et al. (1992) estudaram a evolução de feridas padronizadas em dorso de ratos fêmeas tratados com um laser de HeNe e uma luz halógena não coerente, que foi filtrada para obter o comprimento de onda de 633 nm. Utilizaram fluência de $3,6 \text{ J/cm}^2$. Observaram que a velocidade de fechamento da ferida foi muito maior e estatisticamente significativa nos grupos irradiados com luz coerente (laser de HeNe) em relação aos grupos controle e irradiados com luz não coerente.

Kameya et al. (1995) apresentaram um estudo em ratos onde irradiaram feridas padronizadas nesses animais com diodo laser, emitindo diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 632,8; 680; 830 \text{ nm}$). Observaram diferenças macroscópicas significativas nos grupos irradiados em relação ao controle, embora não fossem estatisticamente significantes entre os diferentes grupos irradiados. Histologicamente observaram que os três grupos irradiados apresentaram maior proliferação de tecido conjuntivo e maior presença de vasos sanguíneos quando comparados aos grupos controles.

Morrone et al. (1998), publicaram um estudo para verificar a ação de um laser diodo de Ga-Al-As sobre trauma muscular. Os autores prensaram músculos de pata posterior de

coelhos adultos e irradiaram com um laser diodo operando em 780 nm, com diferentes parâmetros de irradiação. Os animais foram divididos em 4 grupos. O grupo 1 foi usado como controle, o grupo 2 foi tratado com fluência de 150 J/cm^2 e frequência de 50 Hz, o grupo 3 foi tratado com fluência de 250 J/cm^2 e frequência de 100 Hz e o grupo 4 foi tratado com fluência de 800 J/cm^2 com radiação contínua. A avaliação histológica e histomorfométrica do dano muscular e da cicatrização tecidual demonstraram melhor qualidade e quantidade do processo de reparação nos animais dos grupos irradiados. O grupo onde se obteve o melhor resultado foi aquele irradiado com 800 J/cm^2 e com radiação contínua.

Benedicenti (1982) demonstrou que o fluxo de sangue em capilares mesentéricos aumentava após a irradiação com um diodo laser operando em 904 nm, fenômeno esse confirmado em 1984 por Miró et al., que utilizaram como modelo de estudo o leito de unha e irradiaram com um diodo laser de As-Ga, observando que a circulação da região aumentou após a irradiação. O incremento do fluxo sanguíneo continuou durante 20 minutos após cessar a irradiação com laser, inclusive quando a área alvo foi esfriada.

Resultados similares foram obtidos em 1984 por Mayayo e Trelles, quando irradiaram mucosa anal de ratos. Nesses experimentos o esfíncter final dos capilares foi o primeiro a responder e a resposta dependeu da severidade da lesão na microcirculação.

Estudo realizado em língua de ratos para observação de níveis de histamina local e sistêmica após tratamento com laser emitindo na região do visível, operando em 632,8 nm, utilizando dois tipos de potências ópticas de saída sendo uma de 4 mW e outra de 50 mW com fluência de $2,4 \text{ J/cm}^2$. Os resultados indicaram que com a potência óptica de saída de 4 mW observada localmente nos grupos irradiados, aumento em 100% de histamina e nos grupos irradiados com potência óptica de saída de 50 mW, 30%), além disso os autores observaram, também, diferença significativa na liberação de histamina à nível sistêmico em relação aos grupos controles (Trelles et al, 1988).

1.9.3 Laser Hélio-Neônio (HeNe)

O laser de Hélio-Neônio é gerado a partir da aplicação de uma tensão elevada entre os eletrodos de uma ampola contendo gás de Hélio e de Neônio. A interação entre os dois gases excitados faz com que ocorra decaimento de átomos de Hélio ao seu estado fundamental e assim ocorre a emissão da onda eletromagnética. As ondas geradas são guiadas para fora da ampola por meio de espelhos estrategicamente colocados no interior da mesma. Os lasers de hélio-neônio emitem radiação na região visível vermelha com 632,8 nm (Baxter, 1997; 1998; Low e Reed, 2001; Mello e Mello, 2001).

Este tipo de laser é comumente usado para acelerar a cicatrização de úlceras arteriais, venosas e diabéticas (Souza et al., 1999). A descarga excita os átomos de hélio, os quais transferem sua energia aos de neônio e estes emitem então a luz vermelha (Herch; Teresi, 1987). Sua potência é limitada, praticamente 30 mW a 50 mW, sendo este último valor raras vezes atingido. A penetração da luz de Hélio-Neônio no tecido humano é de 0,8 mm sem divergência e até 15 mm com alguma divergência (Laakso et al., 1993; Kloth, 1997). Este tipo de laser é altamente colimado, gerando, portanto, um maior risco ocular (Baxter, 1997).

Existem vários modelos experimentais que utilizam a irradiação por laser He-Ne. Por exemplo, em mitocôndrias isoladas essa irradiação causa elevação do potencial de membrana e produção de ATP (Passarella et al., 1984); em fibroblastos isolados, com a mesma quantidade de irradiação, observa-se um aumento do índice mitótico das células e da produção do colágeno (Kovacks et al., 1974). O efeito do laser de baixa energia em processos regenerativos pós trauma já foi investigado na pele e no sistema nervoso central e periférico. Essa irradiação mostrou-se capaz de acelerar os processos de regeneração de ferimentos cutâneos e crescimento de vasos sanguíneos na região ferida (Mester et al., 1973; Belkin et al., 1988).

1.9.4 O laser Arsenieto de gálio (GaAs)

O laser AsGa, LIVM 904, com potência de pico de 45 Watts, comprimento de onda (Infravermelho) de 904 nm e densidade de energia em J/cm² é gerado polarizando-se diretamente um diodo constituído de Arsenieto e de Gálio. Este diodo, quando polarizado

diretamente e submetido a uma elevada corrente de circulação, desprende ondas eletromagnéticas com comprimento de onda de 904nm. Estas ondas são guiadas a uma janela de onde o feixe é emitido.

É o valor real da potência aplicada. A potência média é a mesma especificada pelo equipamento se este trabalhar em modo contínuo (ex: laser de Hélio-Neônio). Porém se o laser é emitido na forma pulsada, a obtenção do valor médio de potência é obtido através de alguns cálculos (ex: laser de Arsenieto de Gálio).

O laser de Arsenieto de Gálio trabalha em regime pulsado, no qual o valor da potência média (P_m) é a função da potência de pico (P_p) do laser, da frequência de repetição dos pulsos (f) e do tempo de emissão de laser (t_e), que se inter-relacionam.

O mecanismo que regula a ação do laser de baixa energia não é ainda claramente compreendido. Sabe-se que ele é fotoquímico e a energia proveniente do laser é provavelmente, absorvida em cromóforos intracelulares, e que pode ser convertida em energia metabólica, semelhante ao observado na cadeia respiratória (citocromos) (Belkin et al., 1988; Karu, 1989; Lee; Kim, 1993).

2. Referências Bibliográficas

Aird, S.D.; Silva Junior, N.J.D. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.**, 99: 287-294, 1991.

Amaral, A. **Serpentes do Brasil: Iconografia colorida**. 2. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978. 246p.

Amaral, C.F.S.; Rezende, N.A.; Silva, O.A.; Ribeiro, M.M.F.; Magalhães, R.A.; Reis, R.J.; Carneiro, J.G.; Castro, J.R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo** 28: 220-227, 1986.

Araújo, A.L.; Kamiguti, A.; Bon, C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon** 39: 371-375, 2001.

Araújo, A.L.; Donato, J.L.; Leite, G.B.; Prado-Franceschi, J.; Fontana, M.D.; Bon, C.; Rodrigues-Simioni, L. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) venom and caseinolytic fraction. **Toxicon** 40: 1283-1289, 2002.

Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Asperti, M.C.A.; Mandelbaum, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon** 23: 691-706, 1985.

Assakura M.T.; Mandelbaum F.R. Cleavage of immunoglobulins by *moojeni* protease A, from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon** 28: 734-736, 1990.

Barbosa, P.S.; Havt A.; Faço, P.E.; Sousa, T.M.; Bezerra, I.S.; Fonteles, M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Monteiro, H.S. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon** 40: 1427-1435, 2002.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, Quintero A, Lizano S, Gutiérrez JM, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol. B** 127, 21-30, 2000.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI (2001) Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** 39, 1863-1869, 2001.

Barraviera, B.; Pereira, P.C.M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops*. In: Barravieira, B. (Ed.) **Venenos Animais: uma Visão Integrada**. Publicações Científicas: Rio de Janeiro, 1994. p.261-280.

Battellino, C.; Piazza, R.; Silva, A.M.; Cury, Y.; Farsky, H.P. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** 41: 583-593, 2003.

Baxter, D. Laserterapia de baixa densidade. In: Kitchen, S.; Bazin, S. **Eletroterapia de Clayton**. Manole:São Paulo, 1998. Cap. 13. p. 191-209.

Baxter; G.D.; Noble; G.; Lowe; A.S.; Walsh; D.M. Effect of low intensity monochromatic infrared (890nm) irradiation using a multisource array upon conduction latencies in the human median nerve. **Lasers Surg. Med.**, Suppl. 9, p.8, 1997.

Belkin, M.; Zaturunsky, B.; Schwartz, M.A critical review of low energy laser bioeffects. **Lasers light Ophthalmol.**, 2: 63-71, 1988.

Benedicenti, A. La valutazione dell' effecto del la luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: Benedicenti, A. **Atlante di Laser-Terapia**. Langa Grafica:Gênova, 1982. p. 71-83.

Bieber, A.L. Metal and Non-Protein Constituents in Snake Venoms. In: Lee, C.Y. (Ed). **Snake Venoms**. Springer:Berlin, 1979. p. 295-304,

Bieber, A.L.; McParland, R.H.; Becker, R.R. Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. **Toxicon** 25: 677-680, 1987.

Bihari, J.; Mester, A.R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomised double blind comparative study. **Laser Ther.** 1: 97, 1989.

Bjarnason, B.; Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, 62: 325-372, 1994.

Bieber, A. L., McParland, R. H. e Becker, E. R. Amino acid sequence of miotoxins from *Crotalus viridis concolor*. **Toxicon** 25: 667-680, 1987.

Boer-Lima, P.A.; Gontijo, J.A.; Cruz-Höfling, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61: 698-706, 1999.

Boer-Lima, P.A.; Gontijo, J.A.; Cruz-Höfling, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 67: 217-222, 2002.

Borja-Oliveira, C.R.; Durigon, A.M.; Vallin, A.C.; Toyama, M.H.; Souccar, C.; Marangoni, S.; Rodrigues-Simioni, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular transmission. **Braz J Med Biol Res.**, 36: 617-624, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Cartilha de Ofidismo (Cobral)**, 2.ed. Brasília, DF., 1991. 32p.

Brasil. Manual de Vigilância Epidemiológica. **Acidentes por Animais Peçonhentos. Identificação, Diagnóstico e Tratamento**. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 1993.

Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, DF., 1998. 132p.

Brasil, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. **Rev. Inst. Méd. Trop** 4: 255-260.1901.

Brasil, V. **Contribution à l'Etude d'Origine Ophidiene**. A. Maloine:Paris, 1905.

Brazil, V., Vellard, J. Action coagulante et anticoagulante des venins. **Ann. Institut. Pasteur** 42: 403, 1928.

Brazil V. Peçonhas. In: Farmacodinâmica, 6ª ed., pp 1044-1074 (Corbett, C.E. Ed.) Rio Grande do Sul: Guanabara, 1982.

Brasil, V. History of the primordia of snake bite accident serotherapy. **Mem. Inst. Butantan** 49: 7-20, 1987.

Brugnera, Jr.; A.; Pinheiro, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**, Pancast:São Paulo, 1998.

Brusés, J.L.; Capaso, J.; Katz, E.; Pilar, G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. **J. Neurochem.**, 60: 1030-1042, 1993.

Bücherl, W. Vital Brazil e as serpentes. In: ___ **Acúleos que Matam**. Cosmos:São Paulo, 133-352, 1980.

Bultrón, E.; Thelestam, M.; Gutiérrez, J.M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1179: 253-259, 1993.

Burdmann, E.A.; Woronik, V.; Prado, E.B. A.; Abdulkader, R.C.; Saldaña, L.B.; Barreto, O.C.O.; Marcondes, M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48: 82-88, 1993.

Cameron, D.; Tu, A.T. Characterization of myotoxin α from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry** 16: 2546-2553, 1977.

Camey, K.U.; Velarde, D.T.; Sanches, E.F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of *Bothropic* antivenom in Brazil. **Toxicon** 40: 501-509, 2002.

Campbell, J.A.; Lamar, W. W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press:Ithaca, NY, 1989.

Cardoso, J.L.; Fan, H.W.; Franca, F.O.; Jorge, M.T.; Leite, R.P.; Nishioka, S.A.; Avila, A.; Sano-Martins, I.S.; Tomy, S.C.; Santoro, M.L.; et al Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*). **Q. J. Méd.**, 86: 315-325, 1993.

Carvalho, M.A.; Nogueira, F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. **Cad. Saúde Pública**, v.14 (4), out/dez, 1998.

Castro, H.C.; Fernandes, M.; Zingali, R.B. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon** 37: 1404-1416, 1999.

Cate, R.L.; Bieber, A.L Purification and characterization of Mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) toxin and its subunits. **Archs. Biochem. Biophys.**, 189: 397-408, 1978.

Chang, C.; Tseng, K. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 63: 551-559, 1978.

Chippaux, J.P.; Williams, V.; White, J. Snake Venoms variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-1303, 1991.

CIVITOX (Centro de Informações Toxicológicas), Campo Grande, MS, 2002.

Collares-Buzato, C.B.; Le Sueur, L.P.; Cruz-Höfling, M.A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 181: 124-132, 2002.

Condrea, E. Membrane-active polypeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins. **Experientia** 30: 121-129, 1974.

Damico, D.C.; Bueno, L.G.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S.; da Cruz-Hofling, M.A.; Novello, J.C. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon** 46: 222-229, 2005.

Da Silva, O.A.; Lopes, M.; Godoy, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 28: 401-407, 1979.

Dart, R.C.; Horowitz, R.S. Use of antibodies as antivenom: A primitive solution for a complex problem? In: Bon, C.; Goyffon, R. (Ed.). **Envenomings and their Treatments**. Fund. Marcel Mérieux: Lyon, 1996. p.83-84.

De Roodt, A.R.; Dolab, J.A.; Hajos, S.E.; Fernández, T.; Segre, L. Neutralizing capacity of antiophidic sera against the venom of *Bothrops moojeni* (lance-head viper). **Medicina** 57: 667-676, 1997.

De Roodt, A.R.; Dolab, J.A.; Fernández, T.; Segre, L.; Hajos, S.E. Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. **Toxicon** 36: 1025-1038, 1998a.

De Roodt, A.R.; Dolab, J.A.; Galarce, P.P.; Gould, E.; Litwin, S.; Dokmetjian, J.C.; Segre, L.; Vidal, J.C. A study of the venom yield of venomous snake species from Argentina. **Toxicon** 36: 1949-1957, 1998b.

De Roodt, A.R.; Dolab, J.A.; Dokmetjian, J. Ch.; Litwin, S.; Segre, L.; Vidal, J.C.A. comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon** 38: 865-873, 2000.

Díaz, C.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Gene, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venom on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂ anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta** 1070: 455-460, 1991.

Díaz, C.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archs. Biochem. Biophys.**, 298: 135-142, 1992.

Díaz, C.; Lomonte, B.; Zamudio, F.; Gutiérrez, J.M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂, variant from *Bothrops asper* snake venom. **Natural Toxins** 3: 26-31, 1995.

Dias-da-Silva, W.; Guidolin, R.; Raw, I.; Higashi, H.G.; Caricati, C.P.; Morais, J.F.; Lima, M.L.; Yamaguchi, I.K.; Nishikawa, A.K.; Stephano, M.A.; Marcelino, J.R.; Pinto, J.R.; Santos, M.J. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms with venoms of *Bothrops* species. **Mem. Inst. Butantan** 51: 153-168, 1989.

Einstein, A. Zur quantum theorie der strhlung. *Physikalische Zertschrift*, 18:121, 1917. In: Renson, C. E. Lasers in dentistry. **Dent. Update** 16: 371-372, 1989.

Engle, C.M.; Becker, R.R.; Bailey, T.; Bieber, A.L. Characterization of two myotoxic proteins from venom of *Crotalus viridis concolor*. **J. Toxic-Toxic Rev.** 2: 267-283, 1983.

Fan, H.W., Cardoso, J.L.C. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J.; White, J. (Ed.). **Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons**. CRC Press: Boca Raton, 1995. p.667-688.

Fedoseyeva, G.E.; Smolyaninova, N.K.; Karu, T.I.; Zelenin, A.V. Human lymphocyte chromatin changes following irradiation with a He-Ne laser. **Lasers Life Sci.**, 2: 197-205, 1988.

Ferreira, M.L.; Moura-Da-Silva, A.; Motta, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon** 30: 1591-1602, 1992.

Fletcher, J.E.; Lizzo, F.H.; Flechter, Lizzo. Contracture induction by snake venom cardiotoxin in skeletal muscle from humans and rats. **Toxicon** 25: 1003-1010, 1987.

Fohlman, J.; Lind, P.; Eaker, D. Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. **FEBS Lett.**, 84: 367-371, 1977.

Francischetti, I.M.; Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Carlini, C.R.; Guimarães, J.A. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, 119: 21-29, 1998.

Fuly, A.L.; Calil-Elias, S.; Martinez, A.M.; Melo, P.A.; Guimaraes, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A(2) isolated from *Lachesis muta* snake venom. Comparison with lysophosphatidylcholine. **Int J Biochem Cell Biol.**, 35 :1470-1481, 2003.

Furtado, M. de F.; Colletto, G.M.D.D.; Silva, W.D. da. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. 1. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizados. **Mem. Inst. Butantan** 53: 149-159, 1991.

Gasparello-Clemente, E.; Silveira, P.F. Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. **Toxicon** 40: 1617-1626, 2002.

Genovese, W.J. **Revisão Laser**, Pancast:São Paulo, 2000.

Glenn, J.L.; Straight, R.C.; Wolfe, M.C.; Hardy, D.L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. **Toxicon** 21: 119-130, 1983.

Goes, E.G.; Covas, D.T.; Haddad, R.; Pela, C.A.; Formigoni, C.E.; Borges, J.C. Quality control system for blood irradiation using a teletherapy unit. **Vox Sang.**, 86: 105-110, 2004.

Goin, C.J.; Goin, O.B. **Introduction to Herpetology**. Ed. W. H. Freeman and Company:San Francisco. 1971, 353p.

Goldman, L. Comparison of the biomedical effects of the exposure of human tissues to low and high energy lasers. **Ann N Y Acad Sci.**, 29: 802-831, 1965.

Goldman, L. Concurrent epidermal changes after laser impacts. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 24: 369-375, 1991.

Gopalakrishnakone, P.; Dempster, D.W.; Hawgood, B.J.; Elder, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon** 22: 85-98, 1984.

Gordon, J.P.; Zeiger, H.J.; Townes, C.H. The Maser—New Type of Microwave Amplifier, Frequency Standard, and Spectrometer. **Am. Phys. Soc.**, 99: 1264, 1955.

Guidolin, R. Imunoprofilaxia e Imunoterapia. In: Calich, Vera Lucia Garcia; Vaz, C.A.C. **Imunologia Básica**. Artes Médicas:São Paulo, 1989. p.361-376.

Gutiérrez, J.M.; Cerdas, L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Rev. Biol. Trop.**, 32: 213-222, 1984.

Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L.; Odell, G.V. Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22: 115-128, 1984.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Cerdas, L. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of snake *Bothrops nummifer*. **Toxicon** 24: 885-894, 1986.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan** 51: 211-223, 1989.

Gutiérrez, J.M.J.; Nunes, J.; Diaz, C.; Cintra, A.C.O.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R. "Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*." **Exp Mol Pathol.**, 55: 217-229, 1991.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-1424, 1995.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** 82: 841-850, 2000.

Haczeki, O.; Tamura, M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of the rat head. **Adv. Exper. Med. Biol.**, 248: 263, 1989.

Harris, J.B.; M.A.; Johnson, M.A.; Karlsson, E. "Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*." **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 2: 383-404, 1975.

Harris, J.B.; MacDonell, C.A. Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. **Toxicon** 19: 419-430, 1981.

Harris, J.B.; Maltin, C.A. Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. **Br. J. Pharmacol.**, 76: 61-75, 1982.

Harris, J.B.; Cullen, M.J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc. Rev.**, 3: 183-211, 1990.

Heluany, N.F.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Prado-Franceschini, J.; Rodrigues-Simioni, L. Effects induced by Bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** 30: 1203-1210, 1992.

Herch, J.; Teresi, D. **El Rayo Láser**. Salvat Editores S. A:Barcelona, 1987.

Hidalgo, B.E.Q. **Purificación y Determinación de algunas Características de la Fosfolipasa en el Veneno de *Bothrops atrox* (taya x) proveniente de Chiriguaná, Cesar**. 1999. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Nacional da Colômbia, Santafé de Bogotá.

Ho, P.L.; Serrano, S.M.T.; Chudzinski-Tavassi, A.M.; Moura-da-Silva, A.M.; Mentele, R.; Caldas, C.; Oliva, M.L.V.; Batista, I.F.C.; Oliveira, M.L.S. Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochem Biophys Res Commun.**, 294: 879-885, 2002.

Hofmann, H.; Bon, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry** 26: 780-787, 1987.

Hoge, A.R. Preliminary account on neotropical Crotalidae (Viperidae). **Mem. Inst. Butantan** 32: 109-208, 1965.

Hoge, A.R.; Romano-Hoge, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan** 36: 109-208, 1972.

Homsí-Brandenburgo, M.I.; Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26: 615-627, 1988.

Homma, M.; Tu, A.T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. **Br. J. Pathol.**, 52: 538-542, 1971.

Hong, S.; Chang, C. Electrophysiological studies of myotoxin a, isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom, on murine skeletal muscle. **Toxicon** 23: 927-937, 1985.

Howard, D.B.; Gundersen, J.R. Effects and mechanisms polypeptide neurotoxins that act presynaptically. **Am Rev Pharmacol. Toxicol.**, 20: 307-336, 1980.

Ihering, H.V. As cobras do Brasil. **Rev. Mus. Paul.**, 8: 273-378, 1911.

Jiménez-Porras, J. M. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. **Toxicon** 2: 187-195, 1964.

Jorge, M.T.; Ribeiro, L.A.R. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Med. Brás.**, 36: 66-77, 1990.

Jurkovich, G.J. et al. Complications of crotalidae antivenom therapy. **J. Trauma** 28: 1032-1036, 1988.

Kameya, T.; Ide, S.H.; Acorda, J.A.; Yamada, H.; Taguchi, K.; Abe, N. Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Ther.** 7: 33-36, 1995.

Kana, J.S.; Hutschenreiter, G.; Haina, D.; Waidelich, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, 116: 293-296, 1981.

Karlsson, J.; Some features of glycogen metabolism in human skeletal muscle. **Bibl. Nutr. Dieta** 27: 121-125, 1979.

Karu, T. Photobiology of low power laser effects. **Health Physics**, 56: 691-704, 1989.

Kini, R.M.; Evans, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venoms phospholipases A2. **Toxicon** 27: 613-635, 1989.

Kitchen, S.S.; Partridge, C.J. A review of low laser therapy. Part I: Background, physiological effects and hazards. **Physiotherapy** 77: 161-163, 1991.

Kloth, L. **Wound Healing: Alternatives in Management**. Churchill Livingstone:USA, 347-364, 1997.

Kochca, E. The origin of snakes and evolution on the venom apparatus. **Toxicon** 25: 65-106, 1987.

Kouyoumdjian, J.A.; Polizelli, C.; Lobo, S.M. A.; Guimarães, S.M. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto - São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Medicina** 64: 167-171, 1990.

Kouyoumdjian, J.A.; Polizelli, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. **Rev. Inst. Méd. Trop**, 31: 84-90, 1989.

Laakso, L.; Richardson, C.; Cramond, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian Physiother.** 39: 95-99, 1993.

Lee, P.H.; Kim, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wound in rats. **Laser Ther.** 5: 59-64, 1993.

Leite, L.C.C., Furtado, M.F.D.; Correa, T.C.; Raw, I. Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of *Bothrops* by FPLC anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.**, 102: 515-520, 1992.

Lin Shiau, S.Y.; Huang, N.C.; Lee, C.Y. Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, 196:758–770, 1976.

Lochnit, G.; Geyer, R. Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **Eur. J. Biochem.**, 228: 805-816, 1995.

Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Furtado, M.F.; Otero, R., Rosso, J.P.; Vargas, O.; Carmona, E.; Rovira, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon** 28: 1137-1146, 1990.

Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Rojas, G.; Calderón, L. Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. **Toxicon** 29: 695-702, 1991.

Low, J.; Reed, A. **Eletroterapia Explicada: princípios e praticas**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2001. 472 p.

Mcguff, P.E.; Deterling, R.A. J.R.; Bushnell, D.; Gottlieb, L.S.; Roeber, F.; Fahimi, H.D.; Laser Radiation of Malignancies. **Ann N Y Acad Sci.**, 29: 747–757, 1965.

Maeda, N.; Tamiya, N.; Pattabhiraman, T. R.; Russel, F. E. Some chemical properties of the venom of rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. **Toxicon** 16: 431-441, 1978.

Magalhães, R.A.; Ribeiro, M.M.F.; Rezende, N.A.; Amaral, C.F.S. Rabdomiólose secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 28: 228-233, 1996.

Maiman, T.H. Biomedical Lasers Envolv Toward Clinical Applications. **The J. for Hospital Administrators and Department Heads.**, 101: 39-41, 1960.

Malasit, P.; Warrell, D.A.; Chanthavanich, P.; Virivan, C.; Mongkolsapaya, J.; Singthong, B.; Supich, C. Predection, prevention ad mechanism of early (anaphilatic antivenom reatins in victims of snakes bites. **Braz. Med. J.**, 292: 17-20, 1986.

Mancuso, L.C.; Correa, M.M.; Vieira, C.A.; Cunha, O.A.B.; Lachat, J.J.; Selistre-De-Araujo, H.S.; Ownby, C.L.; Giglio, J.R. Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: Isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon** 33: 615-626, 1995.

Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2^a ed. Fundação Nacional de Saúde:Brasilia, 2001. 120p

Mandelbaum, F.R.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwied* (jararaca pintada). **Toxicon** 22: 193-206, 1984.

Mandelbaum, F.R.; Assakura, M.T. Antigenic relationships of hemorrhagic factors and proteinases isolated from the venom of three species *Bothrops* snakes. **Toxicon** 26: 379-385, 1988.

Mayayo, E.; Trelles, M.A. Irradiación láser experimental de la mucosa anal en el ratón de laboratorio. **Inv Clin Laser I**, 4: 28, 1984.

Mebs, D.; Panholzer, F. Isolation of a hemorrhagic principle from Bitis arietans (puff adder) snake venom. **Toxicon** 20: 509-512, 1982.

Mebs, D.; Ehrenfeld, M.; Samejima, Y. Local necrosing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon** 21: 393-404, 1983.

Mebs, D. Myotoxic activity of phospholipases A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon** 24: 1001-1008, 1986.

Mebs, D.; Ownby, L.C. Myotoxic components of snakes venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, 48: 223-236, 1990.

Meier, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon** 24: 41-46, 1986.

Mello, J. B. de; Mello, G.; Scarpel, P. de. **Laser em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2001. 174 p.

Menez, A. Molecular immunology of snake toxins. **Pharmac. Ther.**, 30: 91-113, 1985.

Mester, E.; Spiry, T.; Sjene, B. Effect of low-energy laser rays in wound healing. **Bull. Soc. Int. Chir.**, 2: 169-181, 1973.

Mester, E.; Bacsy, E.; Korenyi, A.; Kovacs, I.; Spiry, T. Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of laser irradiation on wound healing. **Langenbecks Archv Chir.**, Suppl. 261, 1974.

Micholovitz, S.L. **Thermal Agents in Reabilitation**. 3.ed. F.A. Davis Company:Philadelphia, 1996.

Mickinley, A.F.; Harlen, F.; Willock, M.J. Biological interaction of optical radiation. In: Hilger, A. **Hazards of optical radiation** 12: 23, 1988.

Minton, S. A.; Weinstein, S.A. Geographic and ontogenic variation in venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Toxicon** 24: 71-80, 1986.

Miro, H.; Caupe-Charras, C. Estudio Capilaroscópico de la acción del láser As Ga sobre la microcirculación. **Inv. Clin. Laser** 1: 9-13, 1984.

Miserendino, L.J.; Pick, R.M. Laser physics. In: Harris, D. M.; Pick; R. M. **Lasers in Dentistry**. Quintessence: Illinois, 1995. p. 27-38.

Mokri, B. e Engel, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology** 25:1111, 1975.

Monteiro, R.Q.; Foguel, D.; Castro, H.C.; Zingali, R.B. Subunit dissociação, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin-like protein from snake venom. **Biochemistry** 42, 2: 509-515, 2002.

Morrone, G.; Guzzardella, G.A.; Orienti, L.; Giavaresi, G.; Fini, M.; Rocca, M.; Torricelli, P.; Martini, L.; Giardino, R. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In Vivo experimental study. **Lasers Med Sci.**, 13: 293-298, 1998.

Moura-da-Silva, A.M.; D'Império Lima, M.R.; Nishikawa, A.k.; Brodskyn; C.I.; Dos Santos, M.C.; Furtado, M.D.; F.; Dias da Silva, W.; Mota, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon** 28: 181-188, 1990.

Moura-da-Silva,, A.M.; Cardoso, D.F.; Tanizaki, M.M.; Mota, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon** 29: 1471-1480, 1991a.

Moura-da-Silva, A.M.; Desmond, H.; Laing, G.; Theakston, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** 29: 713-723, 1991b.

Nahas, L.; Kamiguti, A.S.; Barros, A.R. Trombin-like and factor x-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thrombs Haemostasis** 41: 314-328, 1979.

Nishioka, S.A.; Silveira, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 47: 805-810, 1992.

Nonato, M.C.; Garrat, R.C.; Mascarenhas, Y.P.; Jesus, W.D.; Assakura, M.T.; Serrano, S.M.; Oliva, G. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a phospholipase A₂ from the venom of the Brazilian snake *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, 57: 599-601, 2001.

Oliveira, F.; Rodrigues, V.M.; Borges, M.H.; Soares, A.M.; Hamaguchi, A.; Giglio, J.R.; Homsí-Brandeburgo, M.I. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 47: 1069-1077, 1999.

Oshima-Franco, Y.; Leite, G.B.; Dal Belo, C.A.; Hyslop, S.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. The Presynaptic Activity of Bothropstoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Basic & Clin. Pharmacol. & Toxicol.**, 95: 175-182, 2004.

Ownby, C.L.; Cameron, D.; Tu, A.T. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **Am. J. Pathol.**, 85: 149-166, 1976.

Ownby, C.L.; Gutierrez, J.M.; Colberg, T.R.; Odell, G.V. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*crotalus viridis*) venom. **Toxicon** 20: 877-885, 1982.

Ownby, C.L.; Colberg, T.R. Classification of myonecrosis induced by snake venom: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) wester diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*) **Toxicon** 26: 459-474, 1988.

Ownby CL, Fletcher JE, Colberg TR. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. **Toxicon** 31: 697-709, 1993.

Ortiz, M.,C., S. et al. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil** 2: 221-236, 2001.

Otero-Patiño, R. *et al.* A randomized blinded comparative trial of one pepsine-digested and two whole IgG antivenoms in *Bothrops* snake bites in Uroba, Colombia. **Am. J. Trop. Med.**, 58: 183-189, 1998.

Passarella, S.; Casamassima, E.; Molinari, S.; Pastori, D.; Quaquiariella, E.; Catalano, I.M.; Cingolani, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon laser. **FEBS Lett.**, 175: 95-99, 1984.

Patel, C.K.N. Continuous-Wave Laser Action on Vibrational-Rotational Transitions of CO₂. **Phys. Rev.**, 136: 1187–1193, 1964.

Perkins, J.R.; Parker, C.E.; Tomer, K.B. The characterization of snake venoms using capillary eletrophoresis in conjunction with eletrospray mass spectrometry: black mambas. **Eletrophoresis** 14: 458-468, 1993.

Petretski, J.H.; Kanashiro, M.; Silva, C.P.; Alves, E.W.; Kipnis, T.L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33: 1293-1300, 2000.

Queiroz, L.S.; Santo Neto, H.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** 23: 341-345, 1985.

Reichl, A.P.; Serrano, S.M.T.; Assakura, M. T.; Mandelbaum, F. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venoms of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Mem. Inst. Butantan** 51: 225-237, 1989.

Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. Proteolytic specificity of *moojeni* protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon** 31: 187-194, 1993.

Rezende, N.A.; Amaral, C.F.S.; Bambirra, E.A.; Lachatt, J.J.; Coimbra, T.M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 22: 407-416, 1989.

Ribeiro, L.A.; Jorge, M.T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, 32: 436-442, 1990.

Ribeiro, R.; Flores C.A.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by cell-dependent mechanism. **Immunology** 73: 472-477, 1991.

Ribeiro, L.; Jorge, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30: 475-480, 1997.

Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E.; Rodrigues-Simioni et al. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon** 3: 1479-1489, 1995.

Rodrigues-Simioni, L.; Zamunér, Stela R.; Cogo, J.C.; Borja, C.R.; Prado Franceschi, Julia; Cruz-Hofling, Maria Alice; Corrado, Alexandre Pinto. Pharmacological evidence for

a presynaptic action of venoms from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) and *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon** 43: 633-638, 2004.

Rodrigues, V. M.; Soares, A. M.; Andrião-Escarso, S. H.; Franceschi, A. M.; Rucavado, A.; Giglio, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie** 83: 471-479, 2001.

Rodrigo, P.; Lerma, E.; Zaragoza, J.R. Efectos de la irradiación láser sobre el tiroides. Estudio experimental en la rata blanca. **Inv Clin Laser** 11: 7-9, 1985.

Rosenfeld, G.; De Langlada, F.G.; Kelen, E.M. Experimental Treatment of Necrosis Produced by Proteolytic Snake Venoms. II. Action of Dexamethasone. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 11: 387-389, 1969.

Rosenfeld, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snakes Bites in South America. In Bücherl, W.; Buckley, E.E. (Ed.). **Venomous animals and their venoms**. American Press: New York, 1971. v.2, p.345-384..

Ruiz de Torrente, R.; Acosta de Perez, O.; Teiblert, P.; Marunak, S.; Koscinczuk, P.; Sanchez Negrette, M. Toxic and enzymatic activities of the *Bothrops moojeni* venom from Argentina. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, 49: 177-183, 1999.

Russel, F.E. Snake venom immunology: historical and practical considerations. **J. Toxicol. Toxicon Rev.**, 7: 1-82, 1988.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica; Acidentes por Animais Peçonhentos; Identificação, Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica" Professor Alexandre Vranjac", Instituto Butantan, 1993.

Salvini, T. F.; Amaral, A. C.; Miyabara, E. H.; Turri, J. A. O.; Danella, P. M.; Selistre de Araújo, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon** 39: 1141-1149, 2001.

Samejima, Y.; Aoki, Y.; Meds, D. Structural studies on a myotoxin from *Crotalus adamanteus* venom. In: Gopalakrishnakone, P.; Tan, C. K. (Ed.) **Progress in Venom and Toxin Research** National Singapore University, 1988. p.186-187

Sanchez, E.F.; Freitas, T.V.; Ferreira-Alves, D.L.; Velarde, D.T.; Diniz, M.R.; Cordeiro, M.N.; Agostini-Cotta, G.; Diniz, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon** 30: 95-103, 1992.

Schvartsman, S., **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**, Ed. Sarvir:São Paulo, 2a ed. 1992. p: 288

Schawlow; A.L.; Townes; C.H. Infrared and Optical Masers. **Phys. Rev.**, 112: 1940–1949, 1958.

Schawlow, A.L. Principles of lasers. **J Clin Laser Med Surg.**, 13: 127-130, 1995.

Sebben, A.; F. A.; Neo, C. L. A.; Nascimento, R.A. do; Brandão, B. A.; Duar. **Cartilha de ofidismo: cobras do Distrito Federal e entorno**. UnB:Brasília, DF, 1996.

Selistre de Araujo, H.S.; White, S.V.; Ownby, C. Sequence analysis of Lys-49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of proteins. **Toxicon** 34: 1237–1242, 1996.

Serrano, S.M.T.; Matos, M.F.C.; Mandelbaum, F.R, Sampaio, C.A.M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom – I. Isolation and activity of two serine

proteinases, MSP1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, 31: 471-481, 1993.

Silveira, J.C.; Lopes, E.E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs-904 nm. (Estudo experimental em cobaias - *Cavia Porcellus*). **Arq Cent Estud Curso Odontol.**, 28: 73-96, 1991.

Sjostrom, L.; al-Abdulla, I.H.; Rawat, S.; Smith, D.C.; Landon, J. A comparison of ovine and equine antivenoms. **Toxicon** 32: 427-433, 1994.

Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Borges, M.H.; Andrião-Escarso, S.H.; Cunha, O.A.B.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R. Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 43: 1091-1099, 1997.

Soares, A.M.; Rodrigues, A.M.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Toyama, M.H.; Lombardi, F.R.; Arni, R.K.; Giglio, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon** 36: 503-514, 1998.

Soares, A.M.; Andrião-Escarso, S.H.; Ângulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Marangoni, S.; Toyama, M.H.; Arni, R.K.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, 373: 7-15, 2000.

Souza, J. R. F.; Monteiro, R. Q.; Castro, H. C.; Zingali, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon** 39: 787-792, 2001.

Stocker, K.; Fischer, H.; Meier, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon** 20: 265-273, 1982.

Svaasand, L. O. Biostimulation with low-intensity lasers : physics or metaphysics? **Nordisk Med.**, 105: 72, 1990.

Tatarunas, A.C.; Matera, J.M.; Dagli, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cir. Brás.**, 13: 86-93, 1998.

Teibler, P.; Acosta de Pérez, O.; Maruñak, S.; Sanchez Negrette, M.; Ortega, H. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. **Biocell.**, 25: 257-264, 2001.

Tempone, A.G.; Andrade, H.F.Jr., Spencer, P.J., Lourenço, C.O., Rogero, J.R., Nascimento, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 280: 620-624, 2001.

Terribile, W.M.V.; Corti, L.; Velussi, C.; Ceccherelli, F.; Boso, C.; Belfontali, S. Experimental wound healing with coherent and non-coherent radiation. **Laser Technol.**, 2: 121-134, 1992.

Trelles, M.A.; Mayayo, E.; Iglesias, J.M. Histological study of the effect of the 632 nm HeNe irradiation on the nasal mucous of the rabbit. Its clinical interest. In: INTERNATIONAL CONGRESS OPTOELEKTRONIK **Proceedings...** 1983. p.105-109.

Trelles, M.A.; Mayayo, E.; Miró, L.; Rigau, J.; Baudin, G.; Lapin, R. Histamine & Low Power Laser. **J. Bloodless Med. Surg.**, 6: 15-16, 1988.

Tsuchida, T.; Aizawa, K.; Baba, J.; Furukawa, K.; Yamamoto, H.; Kawate, N.; Konaka, C.H.; Kato, H.; Hayata, Y.; Ishitsuki, M. Wound healing in mice using He-Ne scanning laser. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, 9: 265-266, 1991.

Tu, A. T. *Venoms: chemistry and molecular biology*. New York: Wiley, 1977. 560p.

Tuner, J.; Hode, L. **Low level laser therapy**: Clinical Practice and Scientific Background. Prima Books: Sweden, 1999.

Van den Bergh, C.J.; Slotboom, A.J.; Verheij, H.M.; de Haas, G.H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A2 and the rationale of the enzymatic activity of lysine49]phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus*' venom. **Eur J Biochem.**, 15: 353-357, 1988.

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** 44: 259-272, 2004.

Zingali, R.B.; Francischetti, I.M.; Carlini, C.R.; Guimarães, J.A. Biochemical and pharmacological screening of snake (*Bothrops*) venoms: characterization of components acting on blood coagulation and platelet aggregation. **Braz. J. Med. Biol. Res**, 21: 763-765, 1988.

Watt, G. Snakebite Treatment an first Aid. In: Campbell J. A., Lamar, W.W. **The venomous reptiles of Latin-America**. Comstock:Ithaca, 1989. p.6-13.

Waylonis, G.W. et. al. Chronic myofasical pain: management by low-output helium néon laser therapy. **Arch. Phys. Méd. Rehab.** 69:1017-1020, 1998. Disponível em <http://www.laser.nu/lllt/LLLT_critic.Htm. Acesso em 12/12/2005.

Williams V, White J. Variation in the composition of the venom from a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year. **Toxicon** 30: 202-206, 1992.

World Health Organization. **Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms**. WHO, Geneva, 1981.

3. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da irradiação do laser Helio-Neônio (HeNe) e Arsenieto de Gálio (GaAs) no músculo gastrocnêmio injetado intramuscularmente (i.m.) com veneno de *Bothrops moojeni* (40 µg/ml), quantificando o grau de lesão e regeneração das fibras musculares através da avaliação enzimática, da proteína mioglobina e da expressão do fator de crescimento endotelial vascular.

AÇÃO DO LASER DE BAIXA POTENCIA USANDO MARCADORES ENZIMÁTICOS E PROTÉICOS APÓS ENVENENAMENTO BOTRÓPICO NO MÚSCULO GASTROCNÊMIO.

Doroty Mesquita Dourado^{1,2}, Renato Arruda³, Maria Alice da Cruz-Höfling^{1*}

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970Campinas (SP), Brazil, and

²Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS, Brazil.

³Laboratório de Análises Clínicas do PRONCOR/Campo Grande/MS.

Running title: LLLT on snake venom-envenomed gastrocnemius

* Correspondence to: Maria Alice da Cruz Höfling, PhD

Tel. (55)(19) 3788 6247; Fax (55)(19) 32893124

E-mail: hofling@unicamp.br

1. Introdução

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* causam efeitos locais graves em humanos e animais experimentais, caracterizados por hemorragia, edema, dor intensa e necrose local (Rosenfeld; Kalen, 1971; Gutiérrez et al., 1981; Jorge et al., 1999). Estes efeitos tem sido atribuídos à ação de proteases (Mandelbaum et al., 1982), fatores hemorrágicos (Assakura et al., 1986) e às fosfolipases.

A miotoxicidade é uma importante ação das fosfolipases (PLA₂), causando um efeito local relevante (Queiroz; Petta, 1984; Queiroz et al., 1985; Gutiérrez; Lomonte, 1989), afetando a integridade da membrana plasmática das fibras musculares e/ou indiretamente, pela isquemia dos vasos da microcirculação e artérias intramusculares (Gutiérrez et al., 1984; Queiroz; Petta, 1984).

Nos locais em necrose, após a remoção dos debris necróticos pelos fagócitos, advém um processo de regeneração muscular normal, com formação de miotubos e fibras musculares regenerativas, que pode ser incompleto, dependendo das dimensões do envenenamento.

A inflamação também possui papel fundamental na lesão local, caracterizando-se por aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e infiltração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Rosenfelt, 1971; Trebien; Calixto, 1989; Lomonte et al., 1993; Farsky et al., 1997).

Além disso, a regeneração do músculo esquelético é dependente da proliferação e diferenciação de células satélites (Mauro, 1961; Bischoff, 1975), que normalmente estão quiescentes, porém, em resposta a estímulos como trauma muscular, tornam-se ativadas, proliferam e fundem-se com as fibras afetadas ou com novas miofibras (Bischoff, 1994; Schultz; McCormick, 1994).

Vários estudos têm investido na procura de procedimentos adequados para promover a regeneração do músculo esquelético em casos de acidentes botrópicos pelo fato de que o antiveneno atua mais sistêmica do que localmente. A irradiação por laser de baixa potência tem se mostrado efetivo na recuperação do tecido muscular lesado (Weiss; Oron, 1992; Dourado et al., 2003), porque potencia o processo de regeneração, como visto em

alguns trabalhos em pele (Mester et al., 1971a, b, c; Mester et al., 1985), osso (Yaakobi et al., 1996; Luger et al., 1998) e sistema nervoso central e periférico.

A terapia com laser de baixa potência induz reações em geral atérmicas da luz, ou produz aumento não significativo da temperatura, o qual não ultrapassa 1°C (Karu, 1987). Assim a ação no tecido é preferencialmente fotobioquímico (Schaffer et al., 2000; Honmura et al., 1993), ou seja, radiações com baixa densidade de potência (DP) 0,01 W/cm² e também baixa densidade de energia (DE) de 1 a 10 J/cm² (Schindl et al., 2000), e ocorre devido à presença de fotorreceptores celulares especialmente sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação ou inibição da atividade enzimática e de reações fotoquímicas (Karu, 1987).

Alguns resultados prévios têm demonstrado que a irradiação do laser Hélio-Neônio (HeNe/632,8 nm) e Arsenieto de Gálio (AsGa/904 nm) promovem a regeneração do músculo esquelético em mamíferos (Weiss, 1992), anfíbios (Bibikova; Oron, 1993, 1995) e minimiza ações do envenenamentobotrópico (Dourado et al., 2003).

Por outro lado, os lasers que emitem luz na região do visível, como o HeNe, e lasers que emitem no infravermelho próximo, como o AsGa, em diferentes comprimentos de onda, têm sido utilizados em pesquisa com células em cultivo e em tecidos de pequenos roedores, incrementando as funções celulares e ativando a divisão e proliferação celular (Martinez et al., 1984; Leung et al., 1985; Rodrigo et al., 1985; Smith-Agreda et al., 1985; 1986; Sarti et al., 1995; Villaplana et al., 1995).

Bihari e Mester (1989) apresentaram um estudo clínico em pacientes portadores de úlceras crurais, que foram divididos em três grupos experimentais. Um grupo foi irradiado com laser de HeNe, outro com a associação de laser de HeNe e um laser diodo emitindo na região do infravermelho próximo e o terceiro com uma luz não-coerente, cujo comprimento de onda foi de 632 nm. Em todos os grupos a fluência utilizada foi de 4 J/cm². Os autores demonstraram a eficácia terapêutica da associação dos diferentes tipos de lasers.

Estudos para verificar os efeitos dos lasers de HeNe e de diodo de AsGa operando em 904 nm, na cicatrização de lesões superficiais em mucosa de cavalos. Neste experimento as feridas foram padronizadas e irradiadas com aplicações diárias, durante 15 dias, com fluência de 8 J/cm². Os resultados tanto macroscópicos quanto microscópicos

mostraram que nos grupos irradiados, além dos animais apresentarem cicatrização mais rápida, nenhum animal desenvolveu infecção, fato esse evidenciável em 70% dos animais dos grupos controle (Gómez-Villamandos et al., 1997).

Bolognani et al. (1991a, b) usaram laser de baixa potência para verificar a sua ação em sistemas enzimáticos celulares. O experimento ocorreu inicialmente com a inativação da enzima desidrogenase láctica (LDH) aumentando o nível de CO₂ no meio de cultivo. A seguir as células foram irradiadas com laser HeNe com fluência de 7,42 J/cm², e cerca de 60% do total da enzima foi reativada parcialmente, sem chegar à recuperação total (100%). Verificou-se, também que a irradiação laser foi ineficaz na estimulação ou inibição da atividade das enzimas ativas, porém quando as enzimas como Na-ATPase, K-ATPase eram inativadas parcialmente (com 3 M-uréia e/ou choque térmico), foram reativados novamente pela ação do laser diodo de AsGa com radiação pulsada, utilizando frequência de 4,5 KHz. Em outro experimento realizou-se a inativação da miosina-ATPase por um aumento na perfusão de CO₂, que após foi recuperada em torno de 20%, pela ação do laser de HeNe.

2. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações dos níveis séricos da enzima Desidrogenase Láctica (LDH), Aspartato Amino Transferase (AST/GOT) e da proteína mioglobina em camundongos que receberam injeção intramuscular de veneno de *Bothrops moojeni* e os efeitos da irradiação local por laser Helio-Neônio (HeNe) e Arsenieto de Gálio (AsGa), como forma de quantificar se a terapia local afeta as ações sistêmicas do envenenamento.

3. Material e Métodos

3.1 Veneno

O veneno bruto foi extraído de serpentes *Bothrops moojeni* capturadas na região do Pantanal/MS, mantidas no Laboratório de Zoologia da UNIDERP, Campo Grande/MS. O veneno extraído foi seco em dessecador a 20°C até o momento do uso e posteriormente estocados a -4°C.

3.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos, Swiss, adultos (20 a 40 g) e provenientes do biotério da UNIDERP-MS. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração e água *ad libitum* em condições ambientais apropriadas.

3.3 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) grupo controle não irradiado e injetado com solução salina estéril 0,9% (0.1 ml/100 g do peso do animal) (S); 2) grupo injetado com veneno e não irradiado com laser (V); 3) grupo injetado com veneno e irradiado com laser arsenieto de Gálio (VGA/904 nm) e 4) grupo injetado com veneno e irradiado com laser Helio-Neônio (VHN/632,8 nm). O período de sacrifício dos animais foi o mesmo para todos os grupos experimentais: 3, 12 e 24 horas e 3, 7 e 21 dias (n = 5 por grupo de animais, Tabela 1). A inoculação da solução salina e do veneno (Figura 1) foi intramuscular (i.m.), na saliência média do músculo gastrocnêmio direito de camundongos, após antissepsia local e tricotomia, durante todo o período experimental. A concentração usada do veneno foi de 40 µg/mL (0.4 mg/Kg) diluído no momento do uso, em solução salina estéril. A utilização de dose de 40µg/mL (0,4 mg/mL) está respaldada na quantidade de veneno geralmente encontrada na glândula de uma serpente do gênero *Bothrops* que é de aproximadamente 50 mg (Rosenfeld,1971) e a partir deste dado e do fato de que as

serpentes nunca injetam todo o conteúdo da glândula em uma picada (Burdmann *et al.*, 1993), a dose foi estabelecida por ser comparativa à dose injetada por estas serpentes nos acidentes com seres humanos (50 mg de veneno em uma pessoa de 50 Kg=0,7 mg/kg).

Tabela 1: Dados relativos aos grupos x períodos

Grupo/Tratamento	Períodos						
	3 h	12 h	24 h	3 d	7 d	21 d	Total
1. S	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	30
2. V	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	30
3. VGA/904 nm	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	30
4. VHN/632,8 nm	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	30
Total							120

S = salina (sem irradiação)

V = veneno bruto sem irradiação Laser

VHN = veneno + irradiação HeNe

VGA = veneno + irradiação AsGa

(n) = número de animais



Figura 1 – Camundongo sendo inoculado com veneno bruto de *B. moojeni* na saliência média do músculo gastrocnêmio

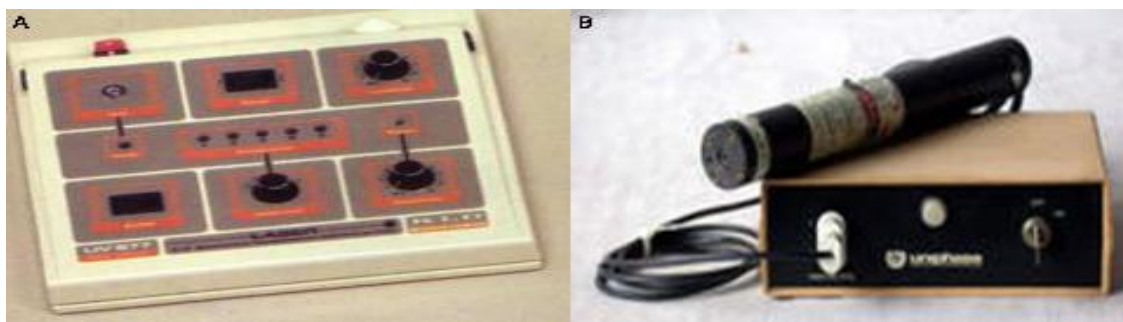


Figura 2 – **A)** Laser Arsenieto de Gálio com densidade de potência de 0,2132 W/cm², comprimento de onda de 904 nm e **B)** Laser Helio-Neônio – luz visível com densidade de potência 0,75 W/cm², comprimento de onda (visível) de 632,8 nm. Ambos com densidade de energia em J/cm².

3.4 Protocolo de utilização do laser Hélio-Neônio (He-Ne) e Arsenieto de Galio (AsGa)

3.4.1 Laser Diodo Arsenieto de Gálio (AsGa)

Laser diodo Arsenieto de Gálio semiconductor GaAs da marca KLD biossistemas (Figura 2A), com potência de pico de 45 W e potencia média de 35 mW, área do feixe a 1cm de distância de 0,1641cm², e comprimento de onda de 904 nm, densidade de energia de 4 J/cm² e densidade de potência de 0.2132 W/cm². O tempo de cada aplicação do laser foi de 18,3 seg (1x/dia).

4.2 Laser Helio Neônio (He-Ne)

O equipamento utilizado foi um laser HeNe (HeNe 1135p series, JDS Uniphase Corp., USA) (Figura 2B) com potência de emissão direta de 10mW e por fibra óptica de 2.1 mW, operando em um comprimento de onda de 632,8 nm, diâmetro de saída da fibra de 0.3 cm² (área = πr^2 e área do feixe a 1cm de distância), energia superficial diária 1.2 J densidade de energia de 4 J/cm² e densidade de potência 0.03 W/cm² foi aplicada perpendicularmente (90°) no músculo gastrocnêmio. O tempo de cada aplicação do laser por sessão de irradiação foi de 120 seg (1x/dia e aparelho automaticamente ajustado).

3.4.3 Metodologia da irradiação

Logo após a injeção do veneno bruto (40 µg/mL), o músculo gastrocnêmio foi irradiado, uma vez ao dia, com dosagem em joules por centímetro quadrados (J/cm²) por 21 dias consecutivos com a primeira aplicação realizada logo após a injeção do veneno de *B. moojeni* (Figura 3). Os animais sacrificados em 3 e 12 h p.i. receberam uma única sessão de irradiação após a injeção do veneno, ao passo que animais sacrificados em 24 h receberam duas irradiações, com a última sendo dada uma hora antes do sacrifício. Animais que foram sacrificados em 3, 7 e 21 dias p.i. receberam 4, 8 e 22 sessões de irradiação (a terapia foi diária e todas no mesmo tempo), respectivamente. Para as sessões de irradiação, o camundongo foi colocado dentro de um tubo de plástico com uma janela cirúrgica na região superior para que ficasse imobilizado e posicionado para receber as sessões de irradiação,

permitindo assim, manipulação mais segura e incidência do feixe de luz perpendicularmente sobre a área afetada pelo veneno. O aparelho foi colocado aproximadamente a 1 cm de distância do local da injeção do veneno, sendo o mesmo procedimento para todos os animais irradiados, com irradiação controlada automaticamente pelo aparelho (18,3 s para AsGa, e 120 s para HeNe). O laser foi aplicado diretamente na pele tricotomizada do lado direito da saliência média do músculo gastrocnêmio. O ângulo da incidência dos raios laser foi mantido perpendicular (90°) sobre a superfície de irradiação.

As doses foram escolhidas porque estudos prévios mostraram um efeito benéfico do laser de baixa potência no processo de regeneração usando doses entre 1 e 4 J/cm² (Mester et al., 1985; Basford, 1993; 1995) enquanto altas doses podem estimular (Braverman et al., 1989) ou retardar o processo de regeneração (Mester et al., 1985).

Nos períodos previstos de: 3, 12 e 24 h, 3, 7 e 21 dias os animais foram anestesiados e sacrificados e amostras do sangue foram coletadas para análise clínica.

3.5 Determinação Bioquímica

Para determinar os níveis séricos das enzimas dos grupos S, V, VGA/904 nm e VHN/632,8 nm (n = 5 camundongos por grupo, Tabela 1) amostras de sangue foram colhidas do plexo orbital diretamente em tubo capilar adequado com heparina, para análise das enzimas, Desidrogenase Láctica (LDH Liquiform) e Aspartato aminotransferase (AST/GOT Liquiform) no soro. Imediatamente depois de coletadas, as amostras de sangue foram centrifugadas (2000 rpm/25 min) para a separação do soro. Imediatamente depois de coletadas, as amostras foram enviadas ao laboratório de Análises Clínicas do PRONCOR, Campo Grande/MS.

A determinação dos níveis de LDH e AST (também denominada GOT) no sangue foi medida por meio de método cinético. Para isso utilizou-se um “kit” LABTEST (Labtest Diagnóstica S.A., Av. Paulo Ferreira da Costa, 600, Lagoa Santa – Minas Gerais - Brasil).

O valor de AST foi expresso em unidades por litro (U/L), (Bergmeyer et al., 1986) com uma unidade de atividade causando a fosforilação de um micromole de AST/min, a 25°C, a qual foi determinada seguindo as especificações estipuladas pelo produtor.

O valor de LDH foi expresso em unidades por litro (U/L), (Westgard et al., 1981) que catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância em 340 nm devido à oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra. A metodologia foi determinada seguindo as especificações estipuladas pelo fabricante.

3.6 Teste imunológico quantitativo para detecção específica de mioglobina no sangue venoso total

Para determinar os níveis do marcador citoplasmático não enzimático, nos grupos S, V, VGA/904 nm e VHN/632,8 nm (n = 5 camundongos/grupo, Tabela 1), amostras de sangue total (venoso) foi coletado do plexo orbital diretamente em tubos de colheita com heparina com anticoagulante. Imediatamente depois de coletadas, as amostras de sangue foram enviadas para o Laboratório de Análises Clínicas do PRONCOR, Campo Grande/MS.

Para a determinação dos níveis de mioglobina no sangue total foi utilizado o “kit” CARDIAC control Myoglobin (Roche Farmacêutica Química, Lda).

A mioglobina é uma proteína muscular que é libertada quando as células do miocárdio e do músculo esquelético sofrem danos. Imunologicamente, não existe nenhuma diferença entre as proteínas do miocárdio e as do músculo esquelético (Tucker et al., 1994).

3.7 Análise Estatística

A comparação entre os grupos experimentais em cada tempo analisado, para as variáveis LDH, AST e mioglobina, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo

teste de Tukey. O mesmo teste foi utilizado para se compararem os diversos tempos em cada um dos grupos experimentais. A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando significativas as diferenças com valor de $p < 0,05$ (Shott, 1990).

4. Resultados

4.1 Medidas séricas de Desidrogenase Láctica (LDH)

Neste trabalho o nível da enzima LDH apresentou diferenças significativas entre os grupos e tempos analisados ($p < 0,001$). O grupo S quando comparado com os demais grupos obteve um menor nível das enzimas ($p < 0,05$).

Porém, avaliando o nível da enzima LDH dentro do mesmo grupo, os valores encontrados no grupo S inicialmente mostrou diferença, sendo que no tempo zero foi significativamente maior ($611 \pm 199,68$) do que os obtidos nos demais tempos (3, 12, 24h e 3, 7 e 21 dias ($p < 0,05$)) e por sua vez nos tempos subsequentes os valores foram iguais.

Em relação aos grupos 3, 12 e 24 h, 3, 7 e 21 dias, o nível de LDH foi significativamente menor nos animais do grupo VGA quando comparado com os animais dos grupos V e VHN ($p < 0,05$), além disso houve diferença significativa na comparação do nível de LDH entre os tempos analisados ($p < 0,001$), sendo em 0, 3 e 12 horas maior do que aquele para 24 horas e 3, 7 e 21 dias ($p < 0,05$).

O grupo V apresentou diferença significativa na comparação do nível de LDH entre os tempos analisados ($p < 0,001$), que se mostrou maior nos tempos 0, 3, 12 e 24 horas do que aquele para os tempos 3, 7 e 21 dias ($p < 0,05$) e no grupo VHN os valores de LDH foi maior nos tempos de 0 a 24 horas do que aquele para os tempos 3, 7 e 21 dias ($p < 0,05$), atingindo um pico máximo entre 0 e 3 h (Figura 4).

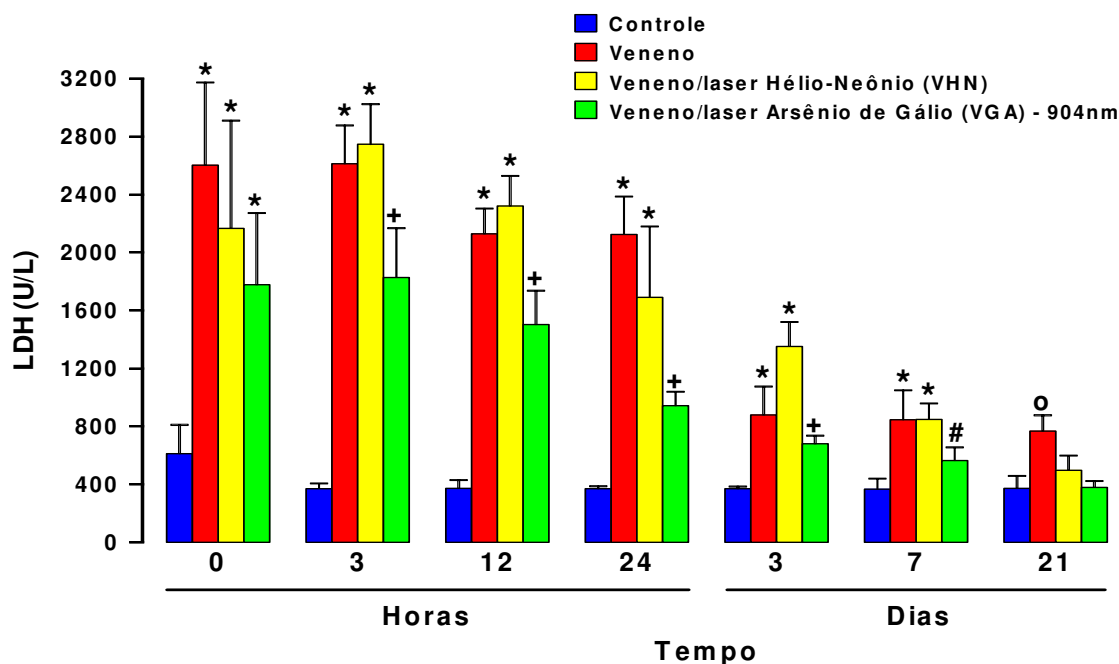


Figura 4: Gráfico ilustrando o nível de LDH (U/L) nos diversos tempos analisados, os grupos controle e experimentais.

* Diferença significativa em relação ao grupo S;

+ Diferença significativa em relação aos grupos S, V e VHN;

Diferença significativa em relação aos grupos V e VHN;

^o Diferença significativa em relação aos grupos S, VHN e VGA – 904 nm.

4.2 Medidas séricas de Aspartato Amino Transferase (AST)

Através dos resultados estatísticos observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) no nível de AST entre os grupos analisados, sendo que o grupo com menores valores foi verificado no grupo S, quando comparado com os animais dos demais grupos, além disso, neste grupo não houve diferença na comparação do nível de AST entre os tempos analisados ($p = 0,16$).

Em relação ao tempo zero, houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos sendo o nível sérico de AST maior nos animais do grupo VHN e, em 12 h significativamente maior quando comparado com os demais grupos (V e VGA), atingindo pico máximo em 24 h.

No grupo VGA, houve diferença significativa ($p<0,001$), sendo em 3 e 12 horas maior do que aquele para o tempo 0 e 24 horas, 3, 7 e 21 dias ($p<0,05$). Por sua vez, o grupo VGA a partir de 12 h o nível de AST foi menor quando comparado com os grupos V e VHN e significativamente menor em 24 h, 3, 7 e 21 dias em relação aos grupos V e VHN ($p<0,05$).

Já no grupo V, em relação aos tempos analisados houve diferença significativa ($p<0,001$) a enzima alcançou nível sérico maior das 3 às 12 horas, do que aqueles dos tempos 0 e 24 horas e 3, 7 e 21 dias ($p<0,05$). Ao compararem-se os valores de AST para o grupo VHN, observou-se que houve diferença significativa ($p<0,001$) em 24 horas cujos valores foram maiores do que aquele para os tempos 0 e 3 h e 3, 7 e 21 dias ($p<0,05$) (Figura 5).

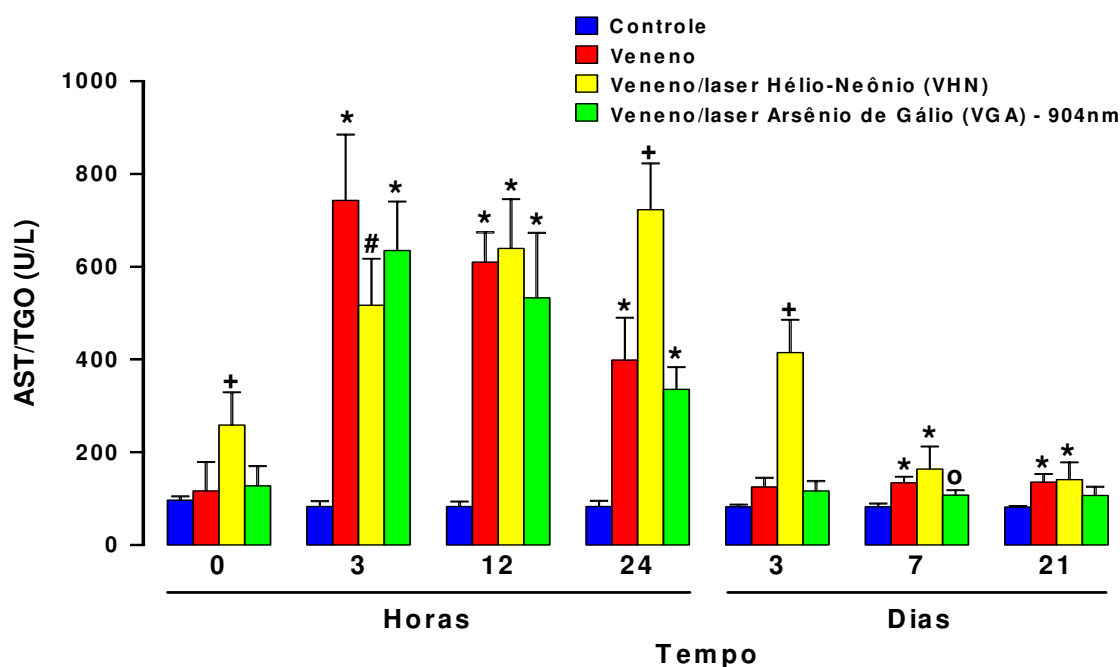


Figura 5: Gráfico ilustrando o nível de TGO (U/L) nos diversos tempos analisados, para os grupos controle e experimentais.

+ Diferença significativa em relação aos grupos S e VGA – 904 nm;

* Diferença significativa em relação ao grupo S;

Diferença significativa em relação ao V;

o Diferença significativa em relação ao grupo VHN

4.4 Dosagem da proteína mioglobina

De acordo com análises estatísticas observou-se que entre os grupos houve diferenças significativas ($p < 0,001$) no nível de Mioglobina, sendo o nível da enzima menor no grupo S em relação aos demais ($p < 0,05$).

No grupo V os valores da enzima foram maiores em relação ao grupo S, VHN e VGA desde 3 horas até 7 dias. Nos tempos de 24 horas até 7 dias os valores se mostraram estatisticamente diferentes em relação ao grupo S, VGA e VHN.

Para o grupo VHN, houve diferença significativa entre os tempos ($p < 0,001$), sendo em 0 hora, o nível sérico de Mioglobina maior do que nos demais tempos ($p < 0,05$), após o qual os valores foram diminuindo. Já o grupo VGA obteve a partir de 12 h até 7 dias diferença significativa entre os grupos (VHN e V), alcançando inclusive nos tempos de 3 e 7 dias valores menores em relação ao grupo controle S (Figura 6).

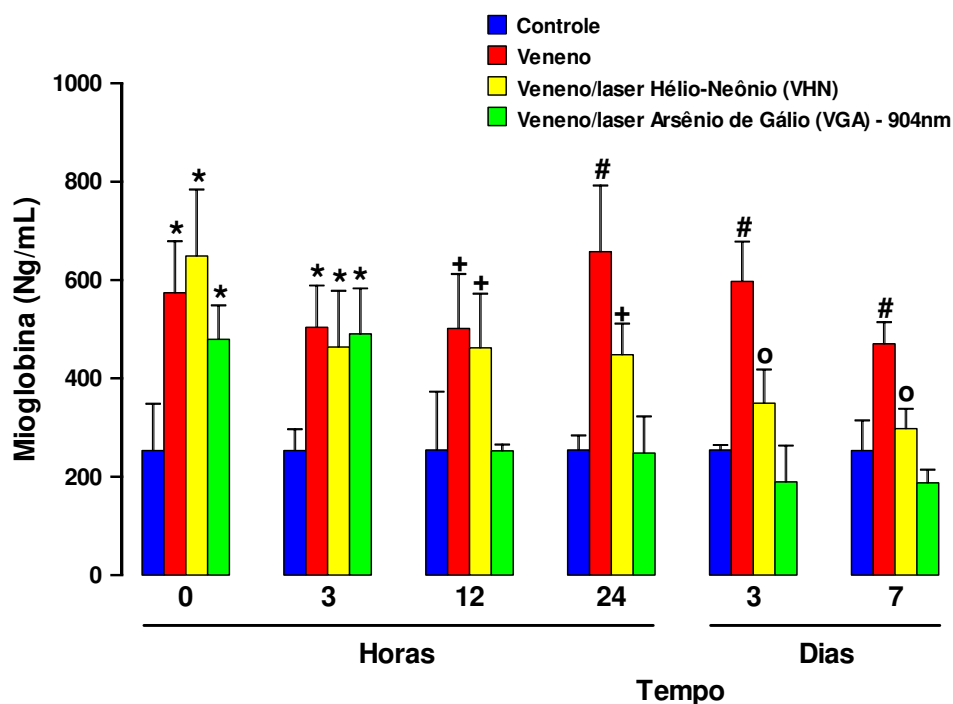


Figura 6: Gráfico ilustrando o nível de Mioglobina (Ng/mL) nos diversos tempos analisados, para os grupos controle e experimentais.

* Diferença significativa em relação ao grupo S;

+ Diferença significativa em relação aos grupos S e VGA – 904 nm;

Diferença significativa em relação aos grupos S, VHN e VGA – 904 nm;

o Diferença significativa em relação ao grupo VGA – 904 nm.

5. DISCUSSÃO

Os estudos que enfocam a ação do laser de baixa potência (low level laser therapy = LLLT) na cicatrização de tecidos e reparação de feridas, principalmente enfocando lesões cutâneas e, sobretudo aquelas relacionadas à prática médica (úlceras, queimaduras, feridas cirúrgicas) demonstram aceleração e melhora estética das lesões tratadas. Estes trabalhos, também consideram a importância da irradiação do tecido por LLLT nas primeiras 24 horas após a injúria, porque os efeitos bioestimulativos são mais promissores, pois é nessa fase que se observa, nas áreas irradiadas, uma maior afluência de elementos defensivos e um elevado número de mitoses. O pressuposto é verdadeiro em se tratando do processo cicatricial que poderá ter melhores resultados se a retirada de detritos tissulares da lesão ocorrer mais cedo, favorecendo a formação de tecido de granulação nas irradiações seguintes à primeira irradiação e nas subseqüentes tendo como consequência, a aceleração do processo de cicatrização (Smith et al., 1992).

Neste trabalho, foi estudada a ação do laser de baixa potência irradiado sobre o músculo gastrocnêmio (aplicação tópica) sobre parâmetros sistêmicos, considerando-se a atividade das enzimas LDH, AST no soro sangüíneo e da proteína Mioglobina no sangue total, liberada do músculo gastrocnêmio injetado com veneno de *B. moojeni* (40 µg/mL). A enzima LDH e a mioglobina são macromoléculas sarcoplasmáticas encontradas no músculo esquelético e cardíaco. A presença sistêmica das mesmas é indício de lesão muscular e perda da integridade das fibras, porisso foram consideradas neste trabalho, para serem sinalizadoras do processo degenerativo e regenerativo após envenenamento botrópico (40 µg/mL). A medida de sua atividade foi também avaliada após irradiação local com dois tipos de laser (HeNe e AsGa), cujas propriedades físicas e ópticas produzem fotoestimulação e não termoestimulação.

Os valores da proteína mioglobina nos períodos iniciais (zero e 3 h) estavam aumentados no grupo V, VHN e VGA e a partir de 12 horas houve diminuição da atividade da mioglobina no grupo VGA até 7 dias, que se mostrou menor em relação ao grupo controle (S). Já no grupo VHN os valores estavam aumentados desde o início do período

(zero hora) até 7 dias, indicando que o laser HeNe não teve eficácia na prevenção dos efeitos deletérios do veneno. Entretanto o laser diodo AsGa foi muito eficaz não só em relação ao grupo V não irradiado, mas também em relação ao grupo VHN, sugerindo que a fotoestimulação local com este tipo de laser foi talvez capaz de estabilizar a membrana celular, diminuindo a atividade catalítica do veneno.

Observou-se que a enzima LDH no grupo V, apresentava valores aumentados desde a zero hora, diminuindo lentamente em 21 dias, mas ainda mostrando diferença significativa em relação aos grupos S, o que confirma a ação miotóxica do veneno. No grupo VGA, embora a LDH estivesse aumentado nos tempo inicial do processo de degeneração (zero a 12 h), a partir de 24 h este valor diminuíram chegando aos 21 dias próximo aos valores de S. Já no grupo VHN, a enzima se mostrou com elevação máxima em 3 h diminuindo gradativamente após 12, obtendo valores menores, mas ainda maiores em relação ao grupo VGA, em 21 dias. A enzima LDH cataliza a reação final da glicólise anaeróbia participando da conversão do piruvato em ácido láctico. No músculo esquelético, quando há privação do oxigênio, comum durante o exercício, grande quantidade de lactato pode ser formada, liberando íons hidrogênio (H^+) que pode ser aumentado de $100nEq.L^{-1}$ (pH=7,0) para índices elevados no plasma sanguíneo em relação ao repouso e exercício (Pilegaard et al., 1999). No envenenamento botrópico, além da ação proteolítica do veneno, há ação hemorrágica, levando à destruição da microvasculatura na região afetada.

Em relação à enzima AST verificou-se que os valores estavam muito elevados no grupo V até as 24 horas, diminuindo lentamente nos períodos finais chegando aos 21 dias com níveis maiores em relação aos grupos S, VGA e VHN. Em relação ao grupo VHN os níveis estavam aumentados nos períodos iniciais alcançando o seu pico máximo em 24 h, após este período os valores foram diminuindo lentamente, chegando aos 21 dias com níveis maiores em relação ao grupo VGA. A AST é encontrada em alta concentração no miocárdio, fígado, músculo esquelético, rim e cérebro. Seus níveis elevam-se em qualquer forma de oclusão arterial aguda, estando aumentados em proporção, ao grau de isquemia (Pedrini et al., 1994).

Os resultados apresentados pelas enzimas (LDH e AST) e da proteína mioglobina após a injeção do veneno bruto (i.m.) de *B. moojeni*, permite inferir que o laser infravermelho AsGa com comprimento de onda de 904 nm é eficiente em diminuir os

níveis aumentados nos diferentes tratamentos e períodos, contradizendo o que alguns estudos relatam que a radiação laser com luz visível (HeNe) ativa a função enzimática da mitocôndria e a radiação do laser infravermelho (AsGa) afeta a atividade enzimática das membranas celulares.

Cieslar et al (1995) avaliaram a atividade de algumas membranas celulares e enzimas mitocondriais de hepatócitos de ratos irradiados com o laser infravermelho (904 nm) com 8.9mW de potência e 5 min de irradiação diária por 15 dias consecutivos. Eles dosaram várias enzimas e, dentre essas, a LDH que se apresentou aumentada. Os pesquisadores verificaram que a irradiação pelo laser infravermelho ativava significativamente a atividade da enzima LDH e concluíram que o laser não somente afeta as propriedades das membranas, mas também ativa o processo de óxido-redução do organismo, como tem sido observado para a radiação da luz visível (Brunelli; Brunelli, 1995; Oliveira et al, 1999).

O laser AsGa com comprimento de onda de 904 nm apresenta algumas vantagens em relação ao laser HeNe, ou seja, além da menor dimensão, apresenta maior poder de penetração no tecido biológico. Outra vantagem é que este dispositivo pode operar de forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só opera em modo contínuo. O efeito da foto-bioestimulação com laser pulsado foi tema de diferentes trabalhos, sendo que Morrone et al., em 1998, demonstraram que para aplicações *in vivo* a radiação contínua apresenta melhores resultados que a radiação pulsada. No presente estudo a irradiação com o laser diodo AsGa foi contínua.

O comprimento de onda é extremamente importante, pois é ele quem define a profundidade de penetração no tecido alvo (Bourgelaie, 1983; Fuller, 1983). Sabe-se que diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido e as radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do infravermelho médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na superfície, enquanto que na região do infravermelho próximo (820 nm e 840 nm) constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido (Karu, 1989; 1987; Jacques, 1995).

No presente estudo, os valores médios das enzimas e da proteína mioglobina demonstraram-se semelhantes às encontradas na literatura. (Seyama, 1993; O'Farrel et al., 1995; Egginton; Hukliká, 1991; Cavalcante et al., 1998; Jan et al., 2005). Observou-se que

após a inoculação do veneno de *B. moojeni* (Chavéz et al, 1989; Assi; Nasser 1999) os níveis das enzimas e da mioglobina, mostraram-se progressivamente crescentes conforme o aumento do tempo de lesão muscular, confirmado pela liberação de substâncias intracelulares na circulação e corroborando com estudos semelhantes presentes na literatura (Aliev, 1993; Pedrini, 1994; O'Farrel et al., 1995; Gay et al, 2005).

Kiran et al (2004) avaliaram o efeito patológico do veneno de *Bungarus caeruleus*, injetado intramuscularmente em ratos, associado com mudanças bioquímicas séricas. Os resultados mostraram aumentos nos valores das enzimas AST (48%), CK (30%), LDH (6%) após 3 horas, com a dose subletal de 25 microg/kg do veneno de *B. caeruleus*. Contudo, após análise estatística, houve diferença significativa em relação ao grupo controle nas dosagens de LDH, AST e mioglobina, geralmente a partir de 24 horas do envenenamento que representam as fases iniciais, ou seja, a fase de degeneração muscular.

6. CONCLUSÃO

Em todos os períodos avaliados, o nível de LDH e AST foram significativamente menor nos animais do grupo irradiado com laser arsenieto de Gálio (AsGa) quando comparado com os animais do grupo injetado com veneno de *B. moojeni* e irradiados com laser Helio-Neônio.

Os valores obtidos na dosagem da proteína mioglobina, no grupo irradiado com o laser AsGa a partir de 12 h até 7 dias houve diferença significativa entre os grupos injetados com veneno e tratado com laser Hélio-Neônio (HeNe).

Em relação ao laser utilizado neste trabalho, o GaAs com comprimento de onda de 904 nm foi mais eficiente em relação ao laser HeNe, 632,8 nm.

O tratamento com laser AsGa foi capaz de diminuir esses efeitos não só nos períodos relativos à fase degenerativa, mas principalmente foi benéfico para a aceleração da fase regenerativa, enquanto o laser HeNe foi eficiente na fase regenerativa.

7. Referencias Bibliográficas

Aliev, G.; Cirillo, R.; Salvatico, E.; Parro, M.; Prosdocimi, M. Changes in vessel ultrastructure during ischemia reperfusion of rabbit hindlimb: implications for therapeutic intervention. **Microvascular Res.**, 46: 165-176, 1993.

Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** 24: 943-946, 1986.

Assi, A.A.; Nasser, H. An in vitro and in vivo study of some biological and biochemical effects of *Sistrurus malaris barbouri*. venom. **Toxicology** 137: 81-94, 1999.

Basford, J.R. Laser Therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopedics** 16: 541-547, 1993.

Basford, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med.**, 16: 331-342, 1995.

Bergmeyer, H.U.; Scheibe, P.; Wahlefeld, A.W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clin. Chem.**, 24: 58-73, 1978.

Bibikova, A.; Oron, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anal. Rec.** 235: 374-380, 1993.

Bibikova, A.; Oron, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec.**, 241: 123-128, 1995.

Bihari, J.; Mester, A.R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomised double blind comparative study. **Laser Ther.**, 1: 97, 1989.

Bischoff, R. Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. **Anat Rec.**, 182: 215-235, 1975.

Bischoff, R., Heintz, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. **Dev Dyn.**, 201: 41-54, 1994.

Bolognani, L.; Costato, M.; Del Monte, V.; Iotti, L.; Volpi, N. Effect of laser on enzymatic systems; inactivation of muscle lactate deshydrogenase by CO₂ and its reactivation by laser irradiation. **Laser Technol.**, 1: 103-107, 1991a.

Bolognani, L. Reactivation of partially inactivated enzymes by low power laser beams (LPL). **Radiol Med.**, 1: 81-86, 1991b.

Bourgelaie, D.B.C. The Physics of Lasers. In: Arndt, K.A. **Cuttaneous Laser Therapy**. John Wiley & Sons: New York, 1983. p.13.

Braverman, B.; McCarthy, R.J.; Ivankovich, A.D.; Forde, D.E.; Overfield, M.; Bapna, M.S. Effect of helium-neon and laser irradiation on wound healing in rabbits. **Laser Surg Med.**, 9: 50-58, 1989.

Brunelli, G.A.; Brunelli, G.R. Tissue changes at different periods of ischemia. **Int Angiol.**, 14: 232-337, 1995.

Burdmann, E.A.; Woronik, V.; Prado, E.B. A.; Abdulkader, R.C.; Saldaña, L.B.; Barreto, O.C.O.; Marcondes, M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48: 82-88, 1993.

Cavalcanti, A.B.; Heinisch, R.H.; Albino, E.C.; Zunino, J.N. Acute myocardial infarction diagnosis. The value of serum myoglobin levels, compared with creatine kinase MB fraction. **Arq Bras Cardiol.**, 70: 75-80, 1998.

Chávez, F.; Gutiérrez, J.M.; Lomonre, B.; Cerdas, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon** 27: 1085-1093, 1989.

Cieslar, G.; Adamek, M.; Sieron, A.; Kaminski, M. Influence of low-power laser radiation on the activity of some membraneous and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. **Proc. SPIE** 2323: 546-550, 1995.

Dourado, D.M.; Fávero, S.; Baranauskas, V.; da Cruz-Hofling, M.A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers Surg Med.**, 33: 352-7, 2003.

Egginton, S.; Hukliká, N. The effect of torbafiline on enzyme activities in fast and slow muscles with limited blood supply. **Comp Biochem Physiol.**, 99: 163-8, 1991.

Farsky, S.H.; Walber, J.; Costa-Cruz, M.; Curry, Y.; Teixeira, C.F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon** 35: 185-193. 44: 687, 1997.

Fuller, A.T. Fundamentals of Lasers in Surgery and Medicine. In: Dixon, J.A. (Ed.). **Surgical Applications of Lasers**. Year Book Medical Publishers:Chicago, 1983. p.11.

Gay, C.C.; Leiva, L.C.; Marunak, S.; Teibler, P.; Acosta de Perez, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon** 46: 546-54, 2005.

Gómez-Villamandos, R.J.; Santiesteban, J.M.; Vélez-González, M.; Ruiz, I.; Gómez-Villamandos, J.C.; Avila, I. Efectos de la radiación láser en la cicatrización de lesiones superficiales en la mucosa del caballo. **Bol SELMQ** 12: 5-15, 1997.

Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L.; Odell, G.V. Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22: 115-128, 1984.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan** 51: 211-223, 1989.

Honmura, A.; Ishii, A.; Yanase, M.; Obata, J.; Haruki, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers Surg Med.**, 13: 463-469, 1993.

Jacques, S.L. **Absorption Coefficient to Different Wavelength**. Tabela Interna de Consulta do Laser Biology Research. Laboratory of Univ. of Texas M.D. Anderson Cancer Center:Houston, USA, 1995.

Jorge, M.T.; Ribeiro, L.A.; O'Connell, J.L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). **Ann Trop Med Parasitol.**, 93: 401-408, 1999.

Kaczor, J.J.; Ziolkowski, W.; Popinigis, J.; Tarnopolsky, M.A. Anaerobic and Aerobic Enzyme Activities in Human Skeletal Muscle from Children and Adults. **Pediatr Res.**, 57: 331-335, 2005.

Karu, T. **Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy**. **IEEEJ. Quant Elect.**, 23: 1703-1717, 1987.

Karu, T. Photobiology of low power laser effect. **Health Physiol.**, 56: 691-704, 1989.

Kiran, K.M.; More, S.S.; Gadag, J.R. Biochemical and clinicopathological changes induced by *Bungarus coeruleus* venom in a rat model. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.**, 15: 277-287, 2004.

Leung, C.Y.; Manfredi, C.; Roccia, L. Prime Osservazioni Sugli Effectti Collaterali Della Softlaserterapia. In oltre 500 casi trattati ambulatoriamente. **Minere Riflessoter Laserter II.** 1: 35-37, 1985.

Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Hanson, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** 17: 93-105, 1993.

Luger, E.J.; Semion, R.Y.W.; Kogan, G.; Dekel, S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med.**, 22: 97-102, 1998.

McComb, J.M.; McMaster, E.A.; MacKenzie, G.; Adgey, A.A.J. Myoglobin and creatine kinase in acute myocardial infarction. **Br. Heart. J.**, 51: 189-94, 1984.

Mandelbaum, F.R.; Assakura, M.T. Antigenic relationships of hemorrhagic factors and proteinases isolated from the venom of three species *Bothrops* snakes. **Toxicon** 26: 379-385, 1988.

Martinez, F.; Smith Agreda, V.; Ferrez, E.; Cimas, M.; Montesinos, Castro, M.; Martinez, A. Variaciones morfológicas del parénquima pineal tras estimulación con luz láser. **Inv Clin Laser I.**, 4: 21-24, 1984.

Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol.**, 9: 493-495, 1961.

Mester, E.; Spiry, T.; Szende, B.; Tota, J.G. Effect of laser radiation on the wound healing. **Zeitschrift Exper Chi.**, 8: 258, 1971a.

Mester, E.; Szende, B.; Spiry, T.; Sacher, A. Effect of the laser in wound healing. **Lyon Chi.**, 67: 416, 1971b.

Mester, E.; Spiry, T.; Szende, B.; Tota, J.G. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg.**, 122: 532, 1971c.

Mester, E.; Mester, A.F.; Mester, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, 5: 31-39, 1985.

Morrone, G.; Guzzardella, G.A.; Orienti, L.; GiavaresI, G.; Fini, M.; Rocca, M.; Torricelli, P.; Martini, L.; Giardino, R. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In Vivo experimental study. **Lasers Med Sci.**, 13: 293-298, 1998.

Oliveira, N.M.; Parizzotto, N.A.; Salvini, T.F. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med.**, 25: 13-21, 1999.

O'Farrel, D.; Chen, L.E.; Seaber, A.V.; Murrel, G.A.; Urbaniak, J.R. Efficacy of recombinant human manganese superoxide dismutase compared to allopurinol in protection os ischemic skeletal muscle against no reflow. **J. Reconstr Microsurg.**, 11: 107-14, 1995.

Pedrini, L.; Pisano, E.; Masetti, L.; Mitini, A.; Facchini, A.; de Pasquale, V.; Ruggeri, A.; Sacca, A. Ischemia-reperfusion syndrome: an alternative experimental model. **J. Cardiovasc. Surg.**, 35: 431-436, 1994.

Pilegaard, H.; Domino, K.; Noland, T.; Juel, C.; Hellsten, Y.; halestrap, A.P.; bangbo, J. Effect of hight-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. **Am. Physiol. Soc.**, 255-261, 1999.

Queiroz, L.S.; Petta, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 26: 247-253, 1984.

Queiroz, L.S.; Santo Neto, H.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P.; Mandelbaum, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon** 23: 341-345, 1985.

Rodrigo, P.; Lerma, E.; Zaragoza, J.R. Efectos de la irradiación láser sobre el tiroides. Estudio experimental en la rata blanca. **Inv. Clin. Laser** 11: 7-9, 1985.

Rosenfeld, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snakes Bites in South America. In: Bücherl, W.; Buckley, E.E. (Eds.). **Venomous Animals and their Venoms**. American Press: New York, v.2, 345-384, 1971.

Rosenfeld, G.; Kalen, E.M. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application. **Rev Paul Med.**, 77: 149-50, 1971.

Sarti, M.A.; Villaplana, L.A.; Trelles, M.A.; Smith, V.; Ferres, E.; Montesinos, M. Transformations in type II leydig cells in the rat after anterior pituitary irradiation with low incident levels of HeNe Laser Energy. **Laser Therapy**.7: 119-122, 1995.

Schaffer, M.; Bonel, H.; Sroka, R.; Schaffer, P.M.; Busch, M.; Reiser, M. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem Photobiol.**, 54: 55-60, 2000.

Schultz, E., Mc.Cormick, K.M. Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, 123: 213-257, 1994.

Schindl, A.; Schindl, M.; Pernerstorfer-Schon, H.; Schindl, L. Low-intensity laser therapy: a review. **J. Investig. Med.**, 48: 312-326, 2000.

Seyama, A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **Surg Today** 23: 421, 1993.

Shott, S. **Statistics for health professionals**. W.B. Saunders Company:London, 1990.

Smith, R.J.; Birndorf, M.; Gluck, G.; Hammond, D.; Moore, W.D. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. **Plastic Reconstruct Surg.**, 2: 306-310, 1992.

Smith-Agreda, V.; Ferres, E.; Renovell, A.; Sarti, M.A.; Villaplana, L.; Zabaleta, M.; Aparici, L.; Montesinos, M. Aportaciones al estudio de las interacciones morfoquímicas de las células adenohipofisarias tras la estimulación con láser He/Ne 632,8 nm de baja potencia. **Inv Clin Laser II** 2: 51-62, 1985.

Smith-Agreda, V.; Ferres, E.; Montesino, M.; Smith-Ferres, E.; Perez, J.; Zabaleta, M. Alteraciones de la ciclosis celular adeno-hipofisaria tras la estimulación con láser He/Ne e IR. **Inv Clin Laser III** 3: 99-105, 1986.

Trebien, H.A.; Calixto, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by Bothrops jararaca venom. **Agents Actions** 26: 292-300, 1989.

Tucker, J.F.; Collins, R.A.; Anderson, A.J.; Hess, M.; Farley, I.M.; Hagemann, D.A.; Harkins, H.J.; Zwicke, D. Value of serial myoglobin levels in the early diagnosis of patients admitted for acute myocardial infarction. **Ann Emerg Med.**, 24: 704-8, 1994.

Villaplana, L.A.; Trelles, M.A.; Smith-Agreda, V.; Rigau, J. Changes in albino rat testicle interstitial cells after pituitary stimulation in vivo with HeNe Laser. **Laser Therapy** 7: 19-22, 1995.

Yaakobi, T.; Maltz, L.; Oron, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. **Calcif Tissue Int.**, 59: 297-300, 1996.

Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embryol.**, 186: 497-503, 1992.

Westgard, J.O.; Barry, P.L.; Hunt, M.R.; Groth, T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clin Chem.**, 27: 493-501, 1986.

**EFFECTS OF LLLT ON *Bothrops moojeni* SNAKE-ENVENOMED
GASTROCNEMIUS OF MICE USING ENZYMATIC BIOMARKERS**

Doroty Mesquita Dourado^{1,2}, Sílvia Fávero², R Matias²,
Maria Alice da Cruz-Höfling¹

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970 Campinas (SP), Brasil;

²Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS, Brasil.

Running title: **LLLT on snake venom-envenomed gastrocnemius**

Correspondence to: Maria Alice da Cruz Höfling, PhD
Tel. (55)(19) 3788 6247; Fax (55)(19) 32893124
E-mail: hofling@unicamp.br

ABSTRACT

Bothrops snake is responsible for almost 90% of human accidents involving ophidism in Brazil. Bothropic venom contains a range of biologically active substances capable of causing a severe envenoming picture in the victims, whose manifestation is both systemic and local. The ophidic antivenom has no neutralizing effect to block the local degeneration. In this work, mice gastrocnemius injected with *Bothrops moojeni* venom (40 µg/ml), or saline solution (controls) were irradiated with low potency HeNe or GaAs lasers (daily dose of $\sim 4 \text{ J/cm}^2$) and sacrificed in periods ranging from 3 h to 21 days ($n = 5/\text{group}$). Blood biochemistry (creatine kinase, CK; alkaline phosphatase, AlkPase and acid phosphatase, AcPase) and pathological analysis for assessing the degree of myonecrosis and regeneration of gastrocnemius, were done at each time interval. Results showed that HeNe irradiation markedly reduced the CK activity from 3 h till 7 days whereas GaAs from 12 h till 21 days p.i. AcPase activity raised dramatically at 12 h p.i., after which there was a decline that was more accentuated with GaAs. HeNe irradiation induced a gradual increase of AlkPase activity until 24 h and then declined, whereas GaAs caused a remarkable increase from 12 h to 24 h, maintaining significant difference in relation to venom unirradiated mice. Saline-injected mice showed no significant differences in those analyses. We conclude that locally-applied GaAS low level laser therapy is able to alter the serum content of creatine kinase used as marker of local muscle tissue injury, and alkaline and acid phosphatases, used for assessing the systemic response.

Key words: AcPase, AlkPase, *Bothrops moojeni* snake venom, CK, LLLT, myonecrosis

1. INTRODUCTION

Envenoming by snakes of the genus *Bothrops* causes local damage at the site of the bite, the severity of which depends on the amount of venom that was inoculated, the physical conditions of the victims and the lasting for and quality of first aid management. *Bothrops* species accounts for 90% of the notified accidents in rural and forest areas of Brazil (Rosenfeld, 1971; Ministério da Saúde, 1991; Ribeiro et al., 1991; Ferreira et al., 1992; Barraviera and Pereira, 1994), therefore epidemiologically the genus is considered of medical and social importance. The amplitude of effects caused by bothropic snakebite in humans involves a range of systemic alterations including hemorrhage, renal dysfunction (Boer-Lima et al., 1999, 2002), coagulopathies and haemodynamic disturbances (Cardoso et al., 1990), and eventually cardiovascular shock (Cardoso et al., 1993), to which serum therapy is recommended. The envenoming syndrome causes, in addition, fast-developing local skin and skeletal muscle tissues damage that are not neutralized by antiophidic serum, even when administered very precociously. The severe clinical picture of snakebite victims has gathered biochemists, physiologists, molecular and cellular biologists, immunologists, pathologists, clinical physicians, among others in a multidisciplinary approach aimed at the comprehension of the mechanisms involved in the various aspects of snake envenoming. In this work, the search for alternative tools devoted to treat the local venom-induced damage, particularly those related to degeneration caused by myotoxins present in the venom are focused. Since the use of low-power laser irradiation has shown to be effective in several human affections, or to have positive effects in minimizing noxious effects on experimental models of snake envenoming (Amaral et al., 2001, Dourado et al., 2003, Nicolau et al., 2004), we will use HeNe and GaAs laser irradiation to investigate the time course of serum CK activity, a sarcoplasmic enzyme used as marker of muscle fibers loss of integrity, and serum AlkPase and AcPase to assess systemic response to local LLLT. LLLT is a denomination used for lasers whose potency is lower than 1 W (Trelles et al., 1996). In this sense, the enzymes serum levels were traced at different time intervals, ranging from 3 h to 21 days, after *Bothrops moojeni* snake venom intra-muscular injection, and correlated with degenerative (from 3 h to 3 days) and regenerative (from 3 to 21 days) morphological

characteristics seen by light microscopy. The number of irradiation sessions to which the muscle was submitted varied in relation to the time interval after i.m. injection.

2. Material and Methods

2.1 Venom

Venom was harvested from *Bothrops moojeni* snakes (male, adult) captured in Pantanal region (Mato Grosso do Sul State, Brazil) and kept in the Zoology Lab. of UNIDERP-Campo Grande, MS. The venom sample was dehydrated, lyophilized and stored at -4°C .

2.2 Animals

Swiss mice (20-40 g) from the University's Animal House were used. The animals were kept in plastic cages with food and water *ad libitum* in proper environmental conditions. All procedures with animals were carried out according the Brazilian Council on Animal Care (COBEA, 1991) guidelines, and have been approved by the University's Committee for Animal experimentation.

2.3 Experimental Protocol

Six experimental groups of mice were used: 1) control unirradiated injected with 0.9% sterile saline solution (0.1 ml/100 g body weight) (S); 2) injected with 0.9% sterile saline solution and irradiated either with GaAs (SGA), or 3) HeNe laser (SHN); 4) unirradiated injected with venom (V), 5) injected with venom and irradiated either with HeNe (VHN), or 6) GaAs laser (VGA) (0.1 ml/100 g body weight for all groups). The time allowed for sacrifice of the animals was the same for S, SGA, SHN, V, VGA and VHN groups: 3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days ($n = 5$ per experimental sub-groups). Venom and saline injection was intramuscular (i.m.), straight in the belly of the right gastrocnemius muscle, after local antisepsis and trichotomy. Trichotomy was periodically done along the period of

irradiation. The venom concentration used was 40 µg/ml (0.4 mg/Kg) diluted at the moment of use in sterile saline solution.

2.4.1 Laser Helium Neon (HeNe)

Helium-Neon laser (HeNe 1135p series, JDS Uniphase Corp., USA) (wavelength 632.8 nm, direct emission potency 10 mW, beam diameter end 3 mm (beam area = $\pi r^2 \sim 7 \text{ mm}^2$ at 1 cm from the source)*, daily surface energy 1.2 J (incident energy density 4 J/cm² and potency density 0.03 W/cm²) was used applied perpendicularly (90°) to the right gastrocnemius muscle for 120 s daily (automatically adjusted).

*($2.25 \text{ mm}^2 \times 3.14 = 7 \text{ mm}^2$)

2.4.2 Gallium Arsenide (GaAs) Diode Laser

The low-energy gallium arsenide semiconductor laser (LIVM 904 apparatus model, KLD Biosistemas, Equip. Eletr. Ltd., Amparo, SP, Brazil) (wavelength 904 nm, peak potency 45 W, average potency 35 mW, spot size at 1 cm from the source 0.1641 cm, daily surface energy 0.04 J (incident energy density 4 J/cm² and potency density 0.2132 W/cm²) was applied perpendicularly (90°) to the right gastrocnemius muscle for 18.3 s daily (automatically adjusted).

2.5 I.m. venom injection and laser irradiation

Soon after *B. moojeni* venom i.m. injection (40 µg/mL) in the right gastrocnemius muscle of anesthetized mice (with sodium pentobarbital (40-70 mg/ml, i.p.), the first irradiation session was targeted transcutaneously at the injection site. Animals sacrificed at 3 and 12 h p.i. were given a single irradiation session soon after venom injection, whereas to animals sacrificed at 24 h p.i. was given a second session 3 hours before sacrifice. Animals sacrificed at 3, 7 and 21 days p.i. were given 4, 8 and 22 irradiation sessions (daily therapy always at the same time, 18,3 s for AsGa and 120 s for HeNe), respectively. For irradiation sessions, the mice were immobilized, and positioned on their side using a

specially designed device. The right hind limb to be irradiated was extended and rotated outwards to facilitate a right incidence of the laser beam on the venom-injected area. Only the saline- and venom-injected mice groups, which were irradiated, were restrained and immobilized, the unirradiated groups were not ($n = 5$ per group and time interval).

The incident energy densities (He-Ne: 4 J/cm^2 and GaAs: 4 J/cm^2) were chosen based on reports describing doses ranging from 1 to 4 J/cm^2 as more efficacious for regenerative processes (Mester et al., 1985, Basford 1993, 1995). No other type of therapy, pharmacological or physical, was given to the animal during the experimental procedures.

2.6 Histopathological studies

At the time intervals scheduled in all experiments, the mice (irradiated and unirradiated, controls and envenomed) were anesthetized with sodium pentobarbital (40-70 mg/ml, i.p.). After the anesthetic induction, an incision on the antero-lateral surface of the right hind limb of the animal was made, after which the mice were killed with an overdose of anesthetics. The gastrocnemius muscle was excised and dissected, from its distal until proximal tendinous insertion. Samples of the muscle tissue were collected always maintaining the injection site in the center and 1 – 2 mm of surrounding tissue. Selected samples were fixed in buffered formalin for 24 h, rinsed, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in paraffin. Cross sections $5 \mu\text{m}$ thick were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological qualitative analysis. Digital images were captured using a computer program Image Pro Plus, version 4.1.1.2 for Windows 95/nt/98 1993-2001 Media Cybernetics, LB.

2.7 Serum Creatine phosphokinase, Alkaline and Acid phosphatase activities

Quantitative determination of CK, AlkPase and AcPase serum activities were done in control saline unirradiated (S), saline irradiated (SGA, SHN), envenomed-unirradiated (V), and envenomed irradiated (VGA, VHN) groups ($n = 5$ mice/group), in order to assess the effects of *B. moojeni* snake envenoming and local LLLT efficacy.

2.7.1 CK activity

Blood samples (1.8 a 2.0 mL) of all experimental groups ($n = 5$) were collected by cardiac puncture directly into heparinized tubes at 3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days. Right after collection, the blood samples were centrifuged (2,000 rpm/25 min) for serum separation and colorimetric determination of CK (EC 2.7.3.2) activity using a CK-NAK kit (Wiener Lab., Rosário, Argentina). The CK value was expressed in units/liter (U/l), with one unit defined as the amount of enzyme phosphorylation producing one micromole of NADH/min at 25°C.

2.7.2 AlkPase and AcPase activities

Blood samples (1.8 a 2.0 mL) of all experimental groups ($n = 5$) were collected by cardiac puncture directly into heparinized tubes at 3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days. Right after collection, the blood samples were centrifuged (2,000 rpm/25 min) for serum separation and colorimetric determination of alkaline and acid phosphatase activity using a Gold Analisa-Diagnóstica kit (Belo Horizonte/MG – Brasil). The AlkPase and AcPase values were expressed in units/liter (U/l).

2.8 Statistic analysis

The comparison among the experimental groups at each time interval for each protocol (CK, AlkPase and AcPase) was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey tests ($n = 5$). The same tests were used to compare the time interval variables within each experimental group. The results were reported as the mean $\pm$ SD. The statistic analysis was done using the software Sigma Stat, version 2.0. A p value < 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Histopathological analysis

V group (unirradiated)

The acute local pathological alterations induced by i.m. injection of *B. moojeni* snake venom (3, 12 and 24 h) and the process of recovery that follows (3, 7 and 21 days) are illustrated in Figures 1, 2 and 3, respectively. The degenerative phase of V group (envenomed unirradiated) included the appearance of necrotic areas of muscle tissue as soon as 3 h post-injection (p.i.), the quality and intensity of which was quite the same a 24 h p.i.. It included vascular congestion, hemorrhage, oedema and myolysis (sarcolemma disruption, compacted tortuous bands of myofibrils, condensation and or loss of myofilaments) of the affected fibers and an expressive acute afflux of polymorphonuclear inflammatory cells around the myofibers. The inflammatory infiltration that was prominent at 3 days p.i., decreased by 7 days, and so decreased the number of necrotic fibers (Fig. 2D and 3A). From day 3 to 7 p.i., macrophages coexist with neutrophils. At day 21 inflammatory cells are quite absent (Figs. 1A,D, 2A,D and 3A,D). Edema, represented by interstitial enlargement was more prominent from 12 h to 3 days (Figs. 1D and 2A,D). In parallel, there was destruction of the microvasculature circumscribed into the necrotic area. The regenerative phase starting 3 days p.i. was characterized by the appearance of a few small diameter centered-nucleus myoblasts at the periphery of the lesion (Fig. 2D), which increased in number and size at 7 days p.i., with some presenting two-central nuclei (Fig. 3A). At day 21 p.i., the appearance of muscle fibers was quite normal (Fig. 3D).

VGA group

The differences observed in the VGA group in the periods of 3 and 12 h p.i. was that there was a retard in the afflux of inflammatory polymorphonuclear cells, a decreased interstitial edema and that besides the pathological state of the myofibers was not so advanced than in the unirradiated V group (Figs. 1B,E), there was a faster removal of

damaged cells from the necrotic area (Fig. 2B), and concomitantly a higher number of regenerating cells in comparison with the V group (Figs. 2E).

VHN group

The irradiation with HeNe laser (4 J/cm^2) did not produce improvement neither in the degenerative (from 3 to 24 h) nor in the regenerative one (from 3 to 7 days). The extension and quality of damage seemed worse than in V and VGA group (Figs. 1C,F, 2C,F and 3C). However, at day 21 the muscles irradiated with HeNe laser did not greatly differ histologically from the ones irradiated with GaAs (compare Fig. 3E with 3F).

Saline group

The muscles that were injected with sterile saline did not show morphological alterations, neither the irradiation with GaAs or HeNe produced visible effect on tissue (data not shown).

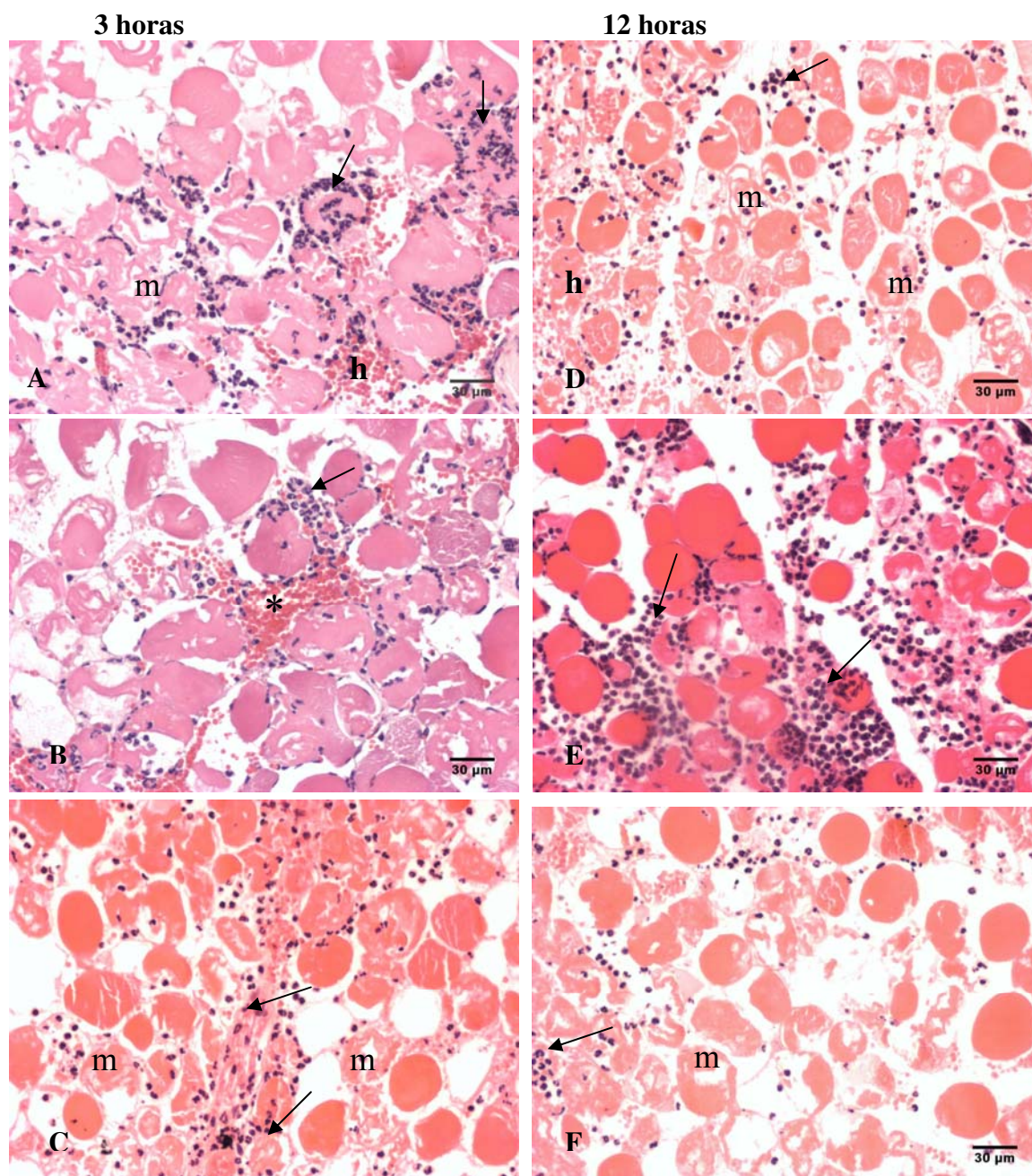


Figure 1 – Light micrographs of cross sections (5 µm) of mouse gastrocnemius under different treatments (groups V, VGA and VHN) and time intervals (3 and 12 h). The *B. moojeni* venom concentration used was 40 µg/ml injected intramuscularly (i.m.). 3 hours: A(V), B(VGA), C(VHN); 12 hours: D(V), E(VGA), F(VHN). Hemorrhage (h); myolysis (m); vascular congestion (*); inflammatory infiltration (→) HE, 200 x.

24 horas

3 dias

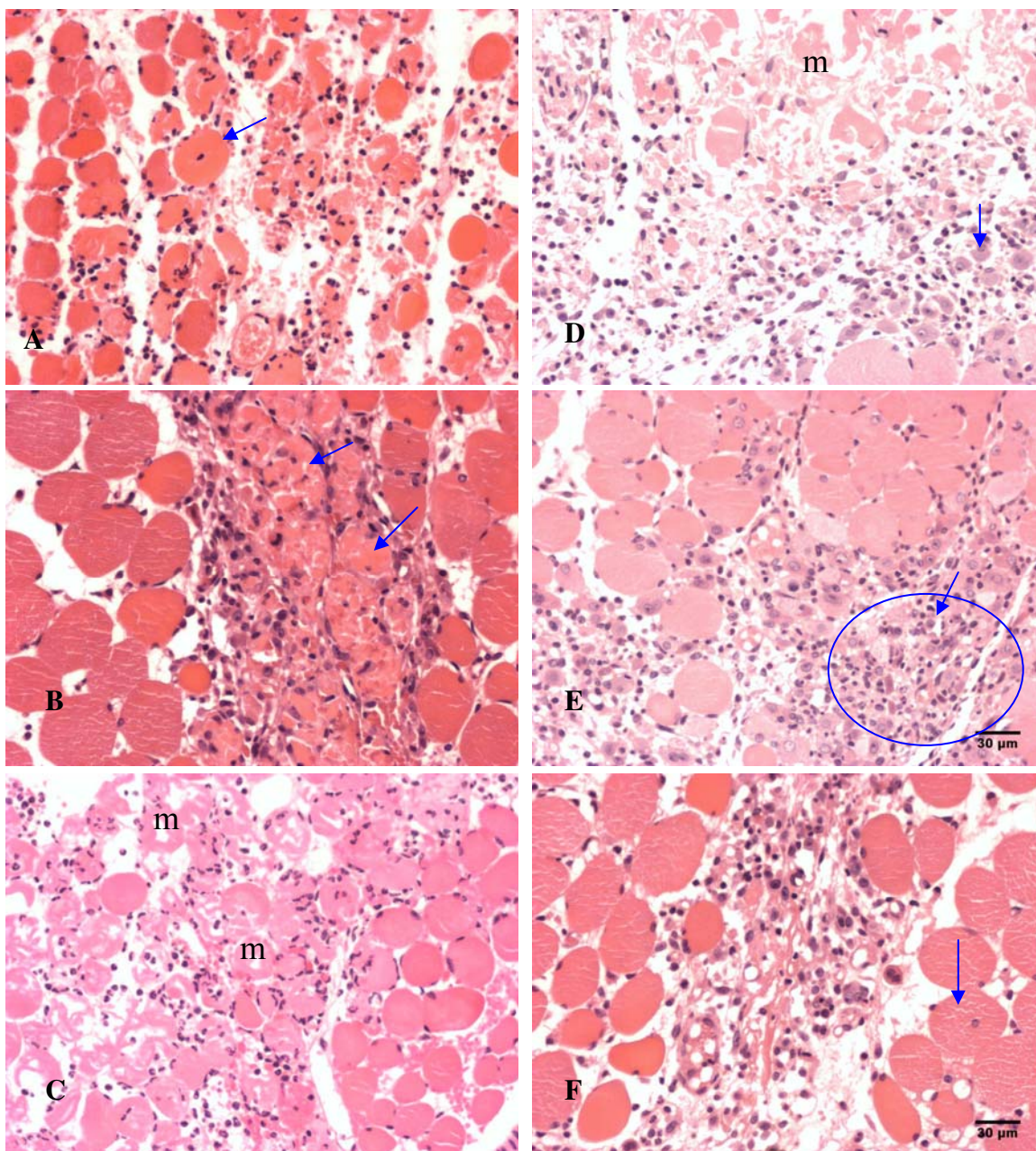


Figure 2 – Light micrographs of cross sections (5 µm) of mouse gastrocnemius under different treatments (groups V, VHN and VGA) and time intervals (24 hours and 3 days). The *B. moojeni* venom concentration used was 40 µg/ml injected intramuscularly (i.m.). 24 hours: A(V), B(VGA), C(VHN); 3 days: D(V), E(VGA), F(VHN). myolysis (m); inflammatory infiltration (→); myoblast (→) HE, 200x.

7 dias

21 dias

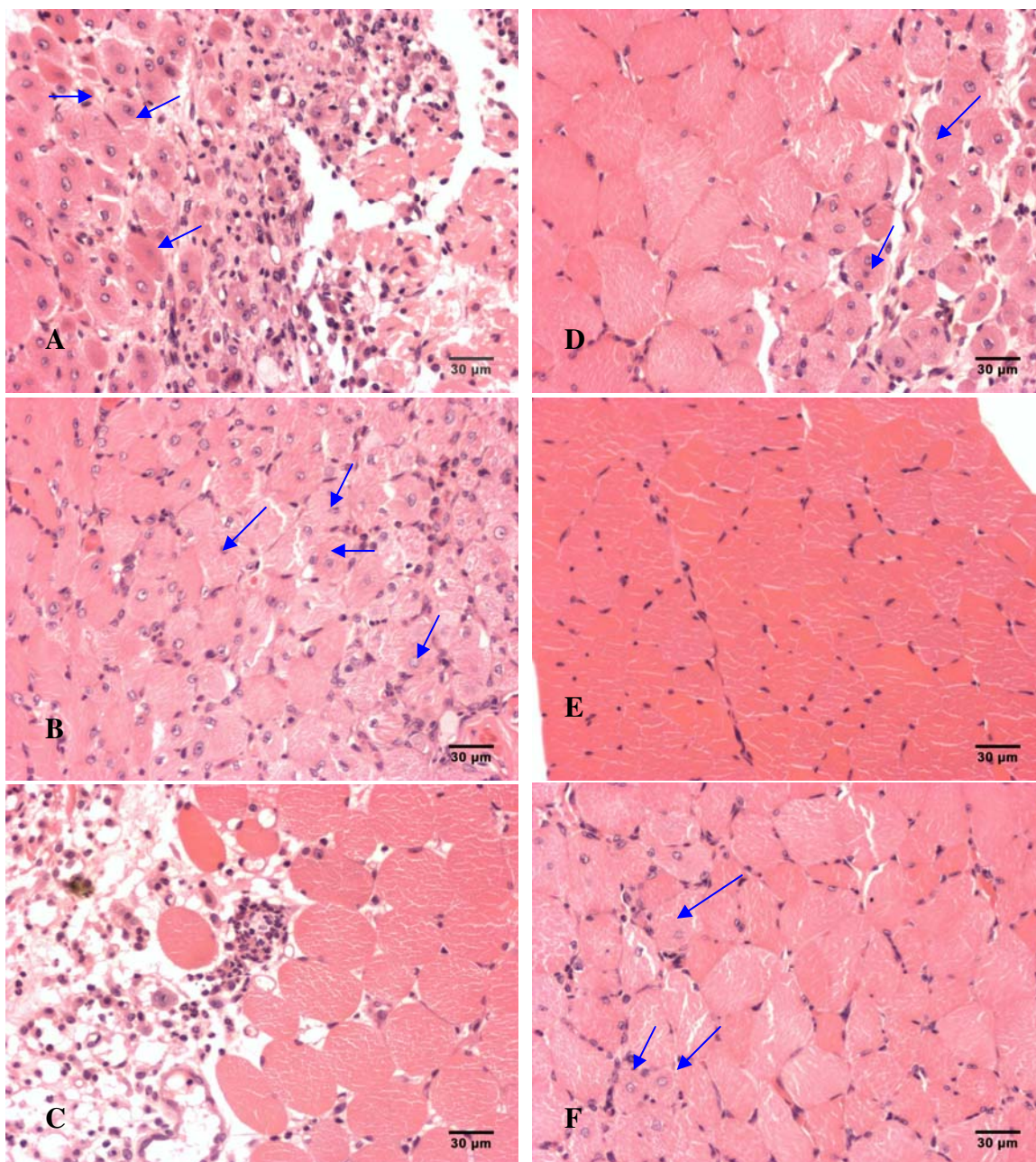


Figure 3 – Light micrographs of cross sections (5 μm) of mouse gastrocnemius under different treatments (groups V, VHN and VGA) and time intervals (24hours and 3 days). The *B. moojeni* venom concentration used was 40 $\mu\text{g/ml}$ injected intramuscularly (i.m.). 24 hours: A(V), B(VGA), C(VHN); 3 days: D(V), E(VGA), F(VHN). Myoblast ($\rightarrow$) HE, 200x.

3.2 Creatine Kinase (CK) serum levels

Snake venom myotoxic activity is preponderant during the initial phases of envenoming, and so CK serum levels.

The animals that were injected with saline solution (S group) and those with saline plus a single session of laser irradiation administered soon after venom injection (SHN and SGA groups) showed basal levels of CK activity close to zero. In contrast, animals that have gastrocnemius injected with *Bothrops moojeni* venom (V group) showed a significant serum CK activity that attained its major level from 3 to 24 h p.i. (460 U/l), after which it dropped to half at day 3, then decreased little until the day 7, and eventually fell down to less than 100 U/l at day 21.

The effect of laser therapy differed between HeNe and GaAs (Fig. 4). Comparison of mice sacrificed 3 and 12 after i.m. injection of venom and submitted to a single irradiation revealed that HeNe prevented better CK release than GaAs in the first 3 h (40% reduction against 8.9% by GaAs). However, whereas VHN mice had CK activity stable in ~270 U/l until day 7, after which it achieved its lowest score (50 U/l) at day 21, a progressive decrease occurred in VGA mice, which exhibited 56% decrease from 12 to 24 h, followed by 40% decrease until day 3, which was maintained until day 7, and eventually achieving the control levels at 21 days (considering that there was 2, 4, 8 and 22 irradiation sessions on animals sacrificed at 24 h, 3, 7 and 21 days).

Altogether, GaAs laser irradiation showed higher efficiency in reducing serum CK levels in comparison with HeNe. The results showed significant differences between VHN and VGA, and irradiated and unirradiated mice ($p < 0.05$) (Fig. 4).

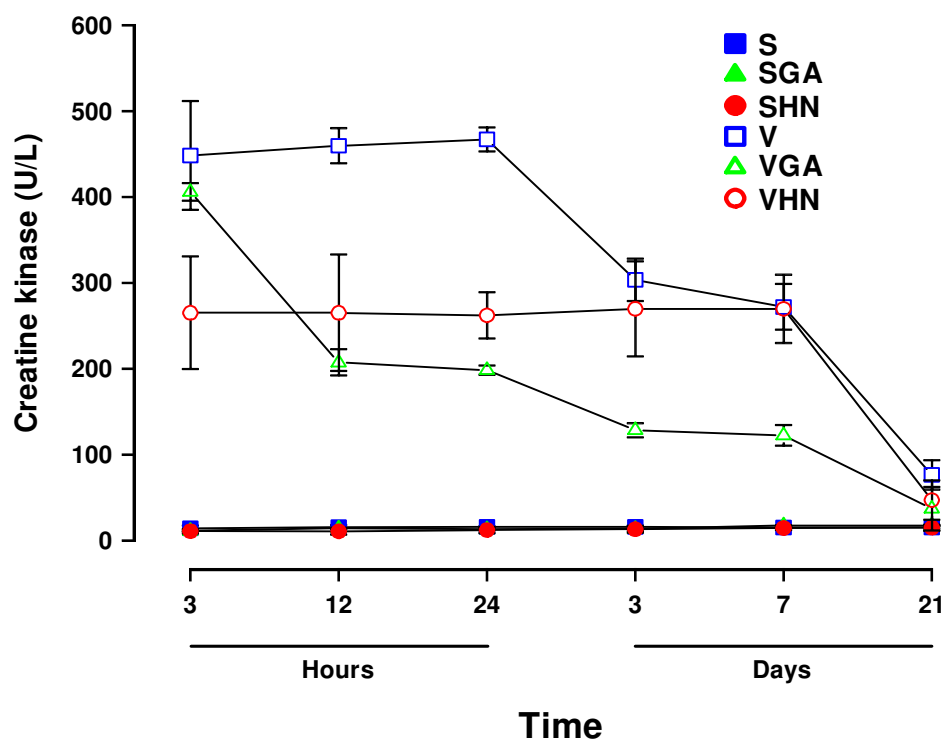


Figure 4 – CK serum concentration of *B. moojeni* venom (40 µg/ml) i.m. injection in the gastrocnemius of mice (group V) in comparison with animals injected with venom plus irradiation with HeNe laser (VHN group) or GaAs laser (group VGA), or with animals injected with 0.9% saline solution (group S) and its respective irradiated groups (SHN and SGA). Each column is the mean $\pm$ S.D. of $n = 5$ experiments. CK concentration is significantly different among V, VHN, VGA and Saline groups. ANOVA ($p = 0.001$) followed by Tukey's Test ($p < 0.05$).

3.3 Alkaline phosphatase serum levels

The serum AlkPase levels of saline injected mice was 75 U/l^{-1} at 3 h, then raised to $\sim 90\%$ at 12 h, and remained unchanged until day 21. Irradiating locally the gastrocnemius soon after injection with HeNe laser (SHN group), decreased significantly the enzyme activity below 60 U/l^{-1} at 3 h, and this value persisted practically unchanged until day 21. Saline group treated with GaAs (SGA) laser followed the same curve as for unirradiated saline, except after 8 and 22 irradiation sessions (i.e., at 7 and 21 days), when there was a significant increase of enzyme activity. The results showed that GaAs laser irradiation in non-venomated mice more likely maintained physiological enzyme activity unaltered (normal

3.4 Acid phosphatase serum levels

There were no significant differences in AcPase activity among S, SHN and SGA groups. However, in venom unirradiated group (V), the activity of the enzyme increased dramatically in the first 12 h and stayed high until day 21 (Figure 6), (F test; $p < 0.05$).

He-Ne laser irradiation of venom injected muscle caused decrease of AcPase activity from 24 h onwards, without though to achieve the ground level of the S group ($p < 0.05$). The irradiation of the animals with GaAs laser likely decreased enzyme activity, but only after day 7 a significant decrease in relation to HeNe laser was apparent ($p < 0.05$). As a rule, treatment with both laser types tended to restore the activity of the enzyme, being GaAs more efficacious. As shown by analysis of variance in a factorial scheme: 6 treatments X 6 time intervals), AcPase activity varied in accordance with the type of treatment and time interval (F test; $p < 0.05$) (Fig. 6).

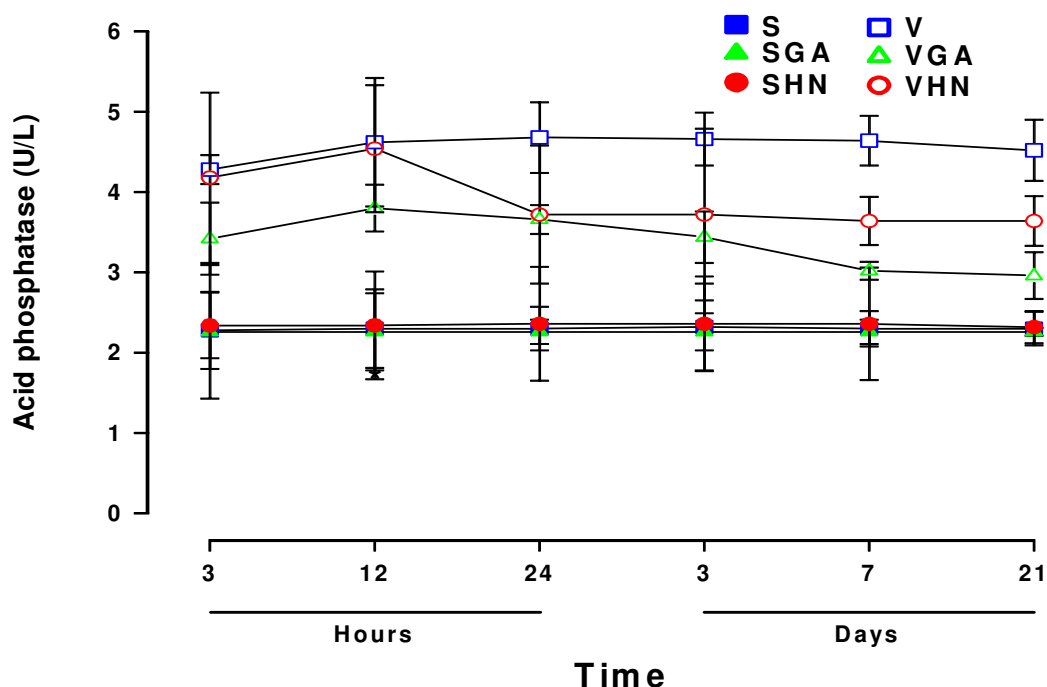


Figure 6 – Acid phosphatase serum concentration of *B. moojeni* venom (40 µg/ml) i.m. injection in the gastrocnemius of mice (group V) in comparison with animals injected with venom plus irradiation with HeNe laser (VHN group) or GaAs laser (group VGA), or with animals injected with 0.9% saline solution (group S) and its respective irradiated groups (SHN and SGA). Each column is the mean $\pm$ S.D. of $n = 5$ experiments. Analysis of variance (ANOVA) ($p=0.001$) followed by Tukey's Test ($p < 0.05$) indicated significant difference among V,VGA,VHN and the respective saline controls.

4. DISCUSSION

Bothropic venoms cause a complex envenoming picture involving toxicological, inflammatory and necrotic processes that can be both local and systemic. Usually, the soft tissues of the victim limbs are the main targets of snakebites. Serum therapy is ineffective against the venom local effects. In the present study, the use of low level laser therapy was evaluated in its ability to counteract snake venom local effects and the systemic effects that follow. The time-course of the skeletal muscle degenerative and regenerative processes was investigated in relation to CK serum levels and histopathological analysis, whereas, the systemic response was evaluated by measurements of alkaline and acid phosphatases serum levels.

The main finding of this study was that *B. moojeni* venom injected intramuscularly in an animal model induces a rapid elevation of serum creatine kinase, alkaline phosphatase and acid phosphatase activities, which courses with necrosis of the muscle at the site of injection, and that photostimulation through LLLT was able to alter the activity of these biochemical markers, as well as accelerate the appearance of regenerating fibers. Our findings in unirradiated venom-injected mice showed that serum CK and alkaline phosphatase activities were still very high at 24 h p.i., decreased gradually from 3 days onwards, but acid phosphatase activity persisted elevated until the end of the experimental period of observation (21 days). These findings are consistent with previous experiments reporting the unbalance of serum proteins caused by snake venoms (Chávez et al., 1989, Sahu et al., 1989, Assi et al., 1999, Mukherje et al., 2000, de Souza-e-Silva et al., 2003, Kiran et al., 2004, Mirajkar et al., 2005). We also find that low level laser therapy, with either HeNe or GaAs lasers applied at the site of gastrocnemius where snake venom was injected, caused a marked decrease of CK activity, being the latter apparently more efficacious than the former. Serial measurements from 3 h to 21 days of serum CK, alkaline phosphatase and acid phosphatase in animals submitted to increasing number of laser irradiations (once a day) showed fluctuation in the laser action. For example, regarding alkaline phosphatase, GaAs laser decreased its activity until 12 h after envenoming, thereafter continuation of irradiations promoted a marked rise of the enzyme activity. AlkPase is an enzyme found

practically in every body tissue, but mostly in cell membrane of renal tubules, osteoblasts, small intestine, and liver (Kiran et al., 2004). In clinical practice, serum levels of this enzyme are useful in investigation of hepatobiliary obstruction and highly osteoclastic activity common to several bone diseases (Muzylak et al., 2002). High levels of alkaline phosphatase synthesis by biliary canaliculi and further release levels are the response to injuries inflicted to the excretory biliary tracts (Kruse; Kracht, 1985; Polo Sabau et al., 2005). Hepatic damage in patients envenomed by Viperid snakes has been reported by Barraviera et al. (1995) who attributed the venom effect to at least two possible mechanisms: on liver mitochondria and/or through cytokine effects, specially interleukin-6 on hepatocyte physiology.

Bothropic venoms are well-known to interfere with haemostasis and this is now known basically due either to toxins activating/inhibiting clotting factors, having effects on blood vessels or interfering with platelet function (Kamiguti et al., 1991; Kamiguti 2005). Liver has essential role in producing fibrinogen, and thrombin, both key-elements of haemostasis. Another point that is worth mention is that the intensity of the benefits given by the two lasers used varied along the experimental time intervals. Since laser dosage is cumulative (Abergel et al., 1986), and that higher energy densities are unsuccessful for biological processes (Kana et al., 1981, Karu, 1989), animals that were sacrificed 3, 12, and 24 h p.i. received 4, 4, 8 J/cm⁻², respectively, whereas animals sacrificed 3, 7 and 21 days p.i. received 16, 24 and 88 J/cm⁻², respectively, of irradiation dose, what would explain fluctuations along the experimental period.

The mechanisms proposed for LLLT effects has been explained by the action of low-intensity visible light on a range of cell events, in which it was demonstrated that light quantum is a pre-requisite for triggering the regulation of cellular metabolism (Karu, 1989). Recent studies have given evidences that improving cell metabolism by irradiation with monochromatic light stimulates microcirculation, neovascularization, and collagen synthesis by fibroblasts (Saperia et al., 1986, Pereira et al., 2002), increases mitochondrial respiration and ATP synthesis (Morimoto et al., 1994; Yu et al., 1997, Schefer et al., 2002), regenerates skeletal muscle fibers (Weiss and Oron, 1992, Bibikova and Oron, 1993), benefits the treatment of infarction (Ad and Oron, 2001), enhances production of vascular

growth factor and growth of endothelial cells *in vitro* (Kipshidze et al., 2001), contributes to repair injured spinal cord nerves (Rockind et al., 2001, Snyder et al., 2002), reverses the toxic effects of chemicals (Karu et al., 2001, Woung-Ripley et al., 2001, Eells et al., 2003), causes proliferation of primary culture of satellite cells and myogenic cell lines (Schefer et al., 2002), and promotes pain relief (Nes and Posso, 2005).

Despite HeNe laser treatment has shown better performance in some time intervals of the experiments, as a whole GaAs apparently was more efficient in optimizing the parameters used to assess laser effects during the degenerative stage (from 3 h to 3 days), and regenerative stage (from 3 to 21 days). HeNe laser is characterized by emission in the visible of the electromagnetic spectrum, however at this region laser radiation has low capacity of penetration in the biological tissues. On the other hand, the semiconductor diode laser GaAs operates in the infrared, therefore the penetration power of this type of laser is better than HeNe (Bourgelaie, 1983; Fuller, 1983). Recent studies devoted to investigate the cellular mechanisms of photobiomodulation have shown that LLLT triggers a chain of molecular and cellular events, which involves gene expression and/or regulation, ATP synthesis and de novo synthesis of proteins (Alexandratou et al., 2002, Shefer et al., 2002, 2003, Zhang et al., 2003, Karu, 2004), what explain the broad spectrum of low laser effects at different biological systems and its involvement in different pathophysiological conditions.

In this work, the attenuation of muscle cells damage seen by histological analysis, and the decline of CK activity in the first 3 to 7 critical days after envenoming, suggests that photostimulation triggers protective mechanisms in the cells that counteracts the toxic effects caused by the venom. The fact that HeNe laser had a stronger protective effect at 3 h p.i. than GaAs raises the possibility that phototherapy at early stages more likely should use laser working in the visible, and then change to a more powerful, such as GaAs working in the infrared. The cellular mechanisms involved in the acute phase of a snake envenoming is certainly different from those of more advanced phases, so it is worth thinking that differences may exist in the response of tissue to photostimulation. Adoption of lasers with different characteristics to be used in combination for therapy is an interesting point to be investigated.

Another interesting point is that despite locally applied (at the site of venom injection in the gastrocnemius) irradiation was able to change systemic parameters. Differently from CK, a sarcoplasmic enzyme that is released to the blood after muscle cell injury (here probably caused by the myolytic activity of the PLA₂ from *B. moojeni* venom), and so a good marker of muscle lesion (Gutiérrez and Lomonte, 1989, Moura-da-Silva et al., 1991b, Oshima-Franco et al., 2000), AlkPase and AcPase are enzymes monitored to assess the clinical conditions of patients. Whereas AlkPase is considered an important marker to access hepatic obstructive processes, increased levels of AcPase are found in blood pathologies involving destruction of erythrocytes and platelets, leukemia and in metabolic diseases.

Venom-injected animals showed an increased level of AlkPase in the plasma, the maximum reached at 24 p.i., which is coincident with high level of circulating venom, before being excreted. HeNe irradiation promoted a slight decrease of the enzyme at this time interval. GaAs showed protective effect with one single irradiation session, i.e., soon after venom administration. Successive irradiations, once a day, affected negatively the levels of the enzyme in the plasma, causing a dramatic rise. AcPase was greatly elevated all along the period of observation (until day 21) after venom injection, and the irradiation with the two types of laser decreased significantly the serum rate of the enzyme by 12 h (GaAs) and 24 h (HeNe) p.i., with GaAs being more efficient than HeNe.

In conclusion, our results suggest that LLLT can be a promising, non-invasive tool to be used as adjuvant of serumtherapy for counteracting the local and systemic effects of envenoming by Bothrops snakes. The mechanism behind this action is a relevant matter to pursue.

5. REFERENCES

- Abergel, R.P.; Lyons, R.; Dwyer, R.; White, R.R.; Uitto, J. Use of lasers for closure of cutaneous wounds: experience with Nd:YAG, argon and CO₂ lasers. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, 12: 1181-1185, 1986.
- Ad, N.; Oron, U. Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. **Int. J. Cardiol.**, 80: 109-116, 2001.

Alexandratou, E.; Yova, D.; Handris, P.; Kletsas, D.; Loukas, S. Human fibroblasts alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochem. Photobiol. Sci.**, 1: 547-552, 2002.

Amaral, A.C.; Parizotto, N.A.; Salvini, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Med. Sci.**, 16: 44-51, 2001.

Assi, A.A.; Nasser, H. An in vitro and in vivo study of some biological and biochemical effects of *Sistrurus malarius barbouri* venom. **Toxicology** 137: 81-94, 1999.

Barraviera, B.; Pereira, P.C.M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops*. In: Barravieira, B. (Ed.) **Venenos Animais: uma Visão Integrada**. Publicações Científicas:Rio de Janeiro, 1994. p.261-280

Barraviera, B.; Coelho, K.Y.; Curi, P.R.; Meira, D.A. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of Sao Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 37: 63-69, 1995.

Basford, J.R. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopedics** 16: 541-547, 1993.

Basford, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med.**, 16: 331-42, 1995.

Bibikova, A., Oron, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anal. Rec.**, 235: 374-380, 1993.

Boer-Lima, P.A.; Gontijo, J.A.; Cruz-Höfling, MA. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61: 698-706, 1999.

Boer-Lima, P.A.; Gontijo, J.A.; Cruz-Höfling, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 67: 217-222, 2002.

Bourgelaie, D.B.C. The physics of Lasers. In: Arndt, K.A. **Cuttaneous laser therapy**. John Wiley & Sons:New York, 1983. p.13.

Brasil. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde. Cartilha de Ofidismo** (Cobral), 2.ed. Brasília, DF., 1991. 32p.

Cardoso, J.L.; Fan, H.W.; Franca, F.O.; Jorge, M.T.; Leite, R.P.; Nishioka, S.A.; Avila, A.; Sano-Martins, I.S.; Tomy, S.C.; Santoro, M.L.; Chudzinski, A.M.; Castro, S.C.; B.; Kamiguti, A.S.; Kelen, E.M.A.; Hirata, M.H.; Mirandola, R.M.S.; Theakston, R.D.G.; Warrell, D.A. Randomised comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Q. J. Med.**, 86: 315-325, 1993.

Chávez, F.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Cerdas, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon** 27: 1085-1093, 1989.

de Sousa-e-Silva, M.C.; Tomy, S.C.; Tavares, F.L.; Navajas, L.; Larsson, M.H.; Lucas, S.R.; Kogika, M.M.; Sano-Martins, I.S. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. **Hum Exp Toxicol.**, 22: 491-500, 2003.

Dourado, D.M.; Fávero, S.; Baranauskas, V.; da Cruz-Hofling, M.A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers Surg. Med.**, 33: 352-357, 2003.

Eells, J.T.; Henry, M.M.; Summerfell, P.; Wong-Ripley, M.T.T.; Buchmann, E.V.; Kane, M.; Whelan, N.T.; Whelan, N.T. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicology. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100: 3439-3444, 2003.

Ferreira, M.L.; Moura-Da-Silva, A.; Motta, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* ativenom. **Toxicon** 30: 1591-1602, 1992.

Fuller, A.T. Fundamentals of Lasers in Surgery and Medicine. In: Dixon, J.A. (Ed). **Surgical Applications of Lasers**. Year Book Medical Publishers:Chicago, 1983. p.11.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan** 51: 211-223, 1989.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** 82: 841-50, 2000.

Kamiguti, A.S.; Theakston, R.D.; Desmond, H.; Hutton, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** 29: 1097-105, 1991.

Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon** 15;45: 1041-1049, 2005.

Kana, J.S.; Hutschenreiter, G.; Haina, D.; Waidelich, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, 116: 293-296, 1981.

Karu, T.I.; Pyatibrat, L.V.; Kalendo, G.S. Cell attachment modulation by radiation from a pulsed semiconductor light diode (wave length = 820 nm) and various chemicals. **Lasers Surg. Med.**, 28: 227-236, 2001.

Karu, T. Photobiology of low power laser effects. **Health Physics** 56: 691-704, 1989.

Karu, T. High-tech helps to estimate cellular mechanisms of low power laser therapy. **Lasers Surg Med.**, 34: 298-299, 2004.

Kini, R.M.; Evans, H.J. Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. **Biochemistry** 14;28: 9209-9215, 1989.

Kiran, K.M.; More, S.S.; Gadag, J.R. Biochemical and clinicopathological changes induced by *Bungarus coeruleus* venom in a rat model. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, 15: 277-287, 2004.

Kipshidze, N.; Nikolaychik, V.; Keelan, M.H.; Shankar, L.R.; Khanna, A.; Kornowski, R.; Leon, M.; Moses, J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, 28: 355-364, 2001.

Kruse, K.; Kracht, U. Isolated elevation of serum alkaline phosphatase. **Deutsch Med. Wochenschr.**, 110: 669-674, 1985.

Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, Morena P, Tomy SC, Antonio LC, Mihara H, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). **Thromb Haemost.**, 63:449-453, 1990.

Mester, E.; Mester, A.F.; Mester, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med.**, 5: 31-39, 1985.

Mirajkar, K.K.; More, S.; Gadag, J.R. Isolation and purification of a neurotoxin from *Bungarus caeruleus* (common *Indian krait*) venom: biochemical changes induced by the toxin in rats. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, 16: 37-52, 2005.

Morimoto, Y.; Arai, T.; Kikuchi, M.; Nakajima, S.; Nakamura, H. Effect of low intensity Argon laser irradiation on mitochondria respiration. **Lasers Surg. Med.**, 15: 191-199, 1994.

Moura-da-Silva, A.M.; Desmond, H.; Laing, G.; Theakston, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** 29: 713-723, 1991b.

Mukherje, A.K., Ghosal, S.K., Maity, C.R. Some biochemical properties of Russell's viper (*Daboia russelli*) venom from Eastern India: correlation with clinico-pathological manifestation in Russell's viper bite. **Toxicon** 38: 163-175, 2000.

Muzylac, M.; Flanagan, A.M.; Inghan, K.; Gunn, N.; Price, J.; Horton, M.A. A feline assay using osteoclast generated in vitro from peripheral blood for screening anti-resorptive agents. **Res. Vet. Sci.**, 73: 283-290, 2002.

Nes, A.G.; Posso, M.B. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. **Int Nurs Rev.**, 52: 68-72, 2005.

Nicolau, R.A.; Martinez, M.S.; Rigau, J.; Tomas, J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. **Lasers Surg Med.**, 34: 277-284, 2004.

Nicolau, R.A.; Martinez MS, Rigau J, Tomas J. Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse. **Lasers Surg Med.**, 35: 236-341, 2004.

Oshima-Franco, Y.; Hyslop, S.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; da Cruz-Hofling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve** 23: 1832-1839, 2000

Ownby, C. L.; Colberg, T.R. Classification of myonecrosis induced by snake venom: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) wester diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). **Toxicon** 26: 459-474, 1988.

Pereira, A.N.; Eduardo, C.P.; Matson, E.; Marques, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, 31: 263-267, 2002.

Polo Sabau, J.L.; Garcia, M.D.L.; Molina, M.R.; Carrion, G.R.; San Miguel, B.T.; Franco, A.L.; Braun Saro, B. Macroscopic liver pathology in patients with dissociated cholestasis. **Rer. Clin. Esp.**, 205: 99-102, 2005.

Ribeiro, R.; Flores C.A.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by cell-dependent mechanism. **Immunology** 73: 472-477, 1991.

Rochkind, S.; Nissan, M.; Alon, M.; Shamir, M.; Salame, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers Surg. Med.**, 28 :216-219, 2001.

Rosenfeld, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snakes Bites in South America. In Bücherl, W.; Buckley, E.E. (Ed.). **Venomous animals and their venoms**. American Press: New York, 1971. v.2, p.345-384.

Sahu, J.K.; Majumdar, G.; Maity, C.R. Effect of envenomation on enzymes of brain of albino rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 27: 831-832, 1989.

Saperia, D.; Glassberg, E.; Lyons, R.F.; Abergel, R.P.; Baneux, P.; Castel, J.C.; Dwyer, R.M.; Uitto, J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. Proposed mechanism for enhanced wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 138: 1123-1128, 1986.

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. *J Cell. Sci.*, 115: 1461-1469, 2002.

Shefer, G.; Barash, I.; Oron, U.; Halevy, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim. Biophys Acta* 1593: 131-139, 2003.

Snyder, S.K.; Byrnes, K.R.; Borke, R.C.; Sanchez, A.; Anders, J.J. Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment. *Lasers Surg. Med.*, 31: 216-222, 2002.

Trelles, M.A.; David, L.M.; Rigau, J. Penetration depth of ultrapulse carbon dioxide laser in human skin. *Dermatol. Surg.*, 22: 863-865, 1996.

Zhang, Y.; Song, S.; Fong, C.; Tsang, C.; Yang, Z.; Yang, M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblasts cells irradiated with red light. *J. Invest Dermatol.*, 120: 849-857, 2003.

Yu, W.; McGown, M.; Ippolito, K.; Lanzafame, R.J. Photostimulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem. Photobiol.**, 66: 866-871, 1997.

Weiss, N.; Oron, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat. Embryol.**, 186: 497-503, 1992.

Wong-Riley, M.T.; Bai, X.; Buchmann, E.; Whelan, H.T. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. **NeuroReport** 12: 3033-3037, 2001.

**LOW-ENERGY LASER IRRADIATION ACCELERATES
NEOVASCULARIZATION OF MOUSE GASTROCNEMIUS INJECTED WITH
BOTHROPS MOOJENI SNAKE VENOM**

Doroty Mesquita Dourado^{1,2}, MsS; Sílvia Fávero², PhD; R Matias², Celso Correia de Souza, PhD², and Maria Alice da Cruz-Höfling^{1*}

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CEP 13083-970 Campinas (SP), Brazil, and

²Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento da Região do Pantanal (UNIDERP), Campo Grande, MS, Brazil.

Running title: Laser effects on neovascularization

*Correspondence to: Maria Alice da Cruz Höfling, PhD

Tel. (55)(19) 3788 6247; Fax (55)(19) 32893124

E-mail: hofling@unicamp.br

ABSTRACT

Snake venoms contain numerous toxic substances which affect a wide range of biological functions including disturbs of coagulation, platelet aggregation, and severe myonecrosis in

the victims. At the snakebite site the severity of damage is not prevented by serumtherapy and disabilities of the affected member can be permanent. In this work, we investigate the action of low power laser irradiation to minimizing the myotoxic acute effects of *Bothrops moojeni* venom in the gastrocnemius of mice, as well as to enhance the regeneration of the affected area. Mice gastrocnemius was injected (i.m.) with 40 µg/ml (0.4 mg/Kg body weight) of venom (n = 90) or 0.9% sterile saline solution (0.1 ml/100 g body weight) (n = 30). From venom group, 30 were unirradiated (V group), 30 were irradiated with HeNe laser (VHN group) and 30 were irradiated with GaAs laser (VGA group). Anesthetized animals were sacrificed at 3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days post injection (p.i.), with one, one, two, four, eight and 22 irradiation sessions given to each period of time, respectively (n = 5/period). Saline group (S) was unirradiated. After sacrifice, the muscles were dissected, processed and immunohistochemistry for Flt-1 receptor (VEGF-R1) was performed on paraffin cross sections. Counting of labeled capillaries was done for evaluating angiogenesis. The results show that the venom decreased the mean number of capillaries in the affected area, and that laser irradiation increased their number. The laser irradiation had no significant effect in minimizing venom effects in the first 12 h p.i. (degenerative stage). HeNe laser irradiation was more effective to increase neovascularization than GaAs, however the number of myotubes was higher at 7 and 21 days p.i. in the VGA group, as was better the cytoarchitecture of the tissue. VEGF was expressed in neutrophilic cells of VHN and V groups, but GaAs irradiation depressed its expression. VEGF was also expressed in macrophages, tenocytes, satellite cells and in normal and envenomed muscle fibers, and in regenerating muscle fibers besides being positive for capillaries. We conclude that the photostimulation promoted by low power laser irradiation promisingly can be used to enhance recovery of snake venom affected muscle.

Key words: Angiogenesis, gastrocnemius, HeNe and GaAs laser irradiation, immunohistochemistry, snake venom.

1.Introduction

Snakebites caused by viperid snakes of the genus *Bothrops* produce in the victim severe local toxic effects which are multifactorial in origin, resulting from the various toxic components of the venom. The local envenoming picture includes skin and muscle necrosis, hemorrhage, intense inflammatory response associated with edema, pain and systemic alterations (Gutiérrez and Lomonte, 1989; 1995; Ownby, 1990). The envenoming syndrome results both from a direct action of toxic components contained in the venom, as well as participation of endogenous mediators produced by the organism (Moura-da-Silva *et al.*, 1996; Rucavado *et al.*, 2002).

The bothropic venom in general contains over 20 components, from which 90% of the dry weight is protein, including toxic (enzymes and non-enzymes) and non-toxic proteins (Bieber, 1979; Bjarnason and Fox, 1994). Specifically, the venom of *B. moojeni* contains enzymes, such as L-aminoacid oxidases, alkaline phosphatase, phosphodiesterases, phospholipases, hialuronidases, 5'-nucleotidases, peptidases, and (metallo)proteases (Assakura *et al.*, 1985; Aird and Da Silva, 1991; Furtado *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1992a; Leite *et al.*, 1992; Gasparello-Clemente and Silveira, 2002), as well as inhibitor of thrombin, among others (Castro *et al.*, 1999), working synergistically or antagonically.

From those, some act on blood coagulation and platelet aggregation, and/or are hemorrhagic, edematogenic, myotoxic, and nephrotoxic, altogether accounting for the necrotizing, sometimes lethal effect of the whole venom (Zingali *et al.*, 1988; Furtado *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1992; Leite *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1992; Francischetti *et al.*, 1998; Ruiz De Torrent *et al.*, 1999; Boer-Lima *et al.*, 1999, 2002; De Roodt *et al.*, 2000).

The venom of Viperine and crotaline snakes, to which belongs *Bothrops* genus, contain one or more hemorrhagins, which are zinc-containing metalloproteases targeting extracellular matrix's proteins, including those of the basement membrane underlying capillary endothelium therefore degrading them (Bjarnason and Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998; Hati *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2000). The hemorrhagic activity of metalloproteases is associated with a proteolytic activity afforded by the divalent cation (Zn^{2+}), since its removal abolishes both the hemorrhagic and proteolytic effects of the enzymes (Bjarnason

and Tu, 1978; Bjarnason and Fox, 1994). From the venom of *B. moojeni*, it was isolated a metalloprotease named *moojeni* protease *a*, which is distinct from the coagulating fractions and represents 1% of the whole venom (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001).

The failure of the microvasculature at the local of snakebite caused by hemorrhagins in combination with the effects of myotoxins that destroy skeletal muscle fibers (Queiroz *et al.*, 1984; Moura-da-Silva *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1995; Rucavado *et al.*, 2002), induces rupture of vascular endothelium and blood cells extravasation by diapedesis or per rhexis (Ownby and Geren, 1987; Cruz-Höfling *et al.*, 1992), which in conjunction with the inflammatory tissue reaction (Moura-da-Silva *et al.*, 1996), contribute to the severity of local toxicity fomented greatly by tissue anoxia and delayed muscle reperfusion. In periods that follow the envenoming, a profound muscular atrophy occurs (Queiroz *et al.*, 1984; Jorge *et al.*, 1999), which can result in permanent disability caused by impaired muscular regeneration. Some hypotheses can be launched to explain the muscle atrophy and the poor regeneration that follows, such as destruction of the tissue architecture making difficult or even preventing migration of repairing satellite cells, microvasculature destruction resulting in poor tissue oxygenation and nutrition (Queiroz *et al.*, 1984), and presence of neurotoxic components in the venom compromising muscle innervation (Gopalakrishnakone *et al.*, 1984; Queiroz *et al.*, 2002).

Antivenom therapy broadly used to counteract the systemic effects of venomous snakebites has shown to be innocuous to prevent the fast developing local destruction of skin and muscle tissues. The search for an efficient first aid management to minimize the severity of local effects is of great relevance.

Low level laser therapy has been used successfully in several clinical conditions, as for healing recalcitrant skin wounds, or dermal and muscle angiogenesis (Bibikova and Oron, 1995; Schindl *et al.*, 1999), tendon healing (Enwemeka, 1992; Reddy *et al.*, 1998), post-fracture bone regeneration (Trelles and Mayayo, 1987; Saito and Shimizu, 1997), post-injury skeletal muscle regeneration (Weiss and Oron, 1992), and crushed sciatic nerve recovery (Rochkind *et al.*, 2001). The widespread range of action of low power laser irradiation has been associated to its capacity of trigger molecular mechanisms inherent to

every cellular event. Low level laser therapy increases ATP production (Karu et al, 1995, Morimoto et al., 1994; Yu et al., 1997; Schefer et al., 2002), mitotic activity (Colls, 1984; Herrero, 1988; Silva et al, 1998; Veçoso, 1993), and synthesis of proteins (Greco et al, 1989; Passarela et al, 1988), all of these essential for tissue regeneration and processes of tissue repair.

An aspect of primordial importance in the process of repair is the recovery of microvasculature in damaged tissues to provide nutrition and conditions for increasing cells mitotic rate, or cell proliferation aimed to restore the physiological conditions. Laser irradiation was shown to enhance production of vascular growth factor and growth of endothelial cells *in vitro* (Kipshidze et al., 2001; Salate et al., 2004).

Common available treatment used after snake envenoming has been ineffective to counteract the toxicity of components of the venom at the site of snakebite. So, it is worth evaluating therapies proved to offer good results in clinical conditions that were also found in snake envenoming local syndrome.

The purpose of this study was to evaluate the action of two types of low power lasers (HeNe and GaAs diode) in neoformation of blood vessels in the mouse gastrocnemius that was injected with the whole venom of *B. moojeni*. The expression of VEGF and the number of capillaries were evaluated.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Venom

Venom was harvested from *Bothrops moojeni* snakes captured in Pantanal region (Mato Grosso do Sul State, Brazil) and kept in the Zoology Lab. of UNIDERP-Campo Grande, MS. The venom sample was dehydrated, lyophilized and stored at – 4°C.

2.2 Animals

In this work 120 Swiss mice (20-40 g) from the University's Animal House were used. The animals were kept in plastic cages with food and water *ad libitum* in proper

environmental conditions. All procedures with animals were carried out according to the Brazilian Council on Animal Care (COBEA, 1991) guidelines.

2.3 Experimental Protocol

Six experimental groups of mice were used: 1) control unirradiated injected with 0.9% sterile saline solution (0.1 ml/100 g body weight) (S); 2) injected with 0.9% sterile saline solution and irradiated either with GaAs (SGA), or 3) HeNe laser (SHN); 4) unirradiated injected with venom (V), 5) injected with venom and irradiated either with HeNe (VHN), or 6) GaAs laser (VGA) (0.1 ml/100 g body weight for all groups). The time allowed for sacrifice of the animals was the same for S, SGA, SHN, V, VGA and VHN groups: 3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days ($n = 5$ per experimental sub-groups). Venom and saline injection was intramuscular (i.m.), straight in the belly of the right gastrocnemius muscle, after local antisepsis and trichotomy. Trichotomy was periodically done along the period of irradiation. The venom concentration used was 40 $\mu\text{g/ml}$ (0.4 mg/Kg) diluted at the moment of use in sterile saline solution.

2.4.1 Laser Helium Neon (HeNe)

Helium-Neon laser (HeNe 1135p series, JDS Uniphase Corp., USA) (wavelength 632.8 nm, direct emission potency 10 mW, beam diameter end 3 mm (beam area = πr^2 at 1 cm from the source, i.e. $\sim 7 \text{ mm}^2$), daily surface energy 1.2 J (incident energy density 4 J/cm² and potency density 0.03 W/cm²) was used applied perpendicularly (90°) to the right gastrocnemius muscle for 120 s daily (automatically adjusted).

2.4.2 Gallium Arsenide (GaAs) Diode Laser

The low-energy gallium arsenide semiconductor laser (LIVM 904 apparatus model, KLD Biosistemas, Equip. Eletr. Ltd., Amparo, SP, Brazil) (wavelength 904 nm, peak potency 45 W, average potency 35 mW, spot size at 1 cm from the source 0.1641cm², daily

surface energy 0.04 J (incident energy density 4 J/cm² and potency density 0.2132 W/cm²) was applied perpendicularly (90°) to the right gastrocnemius muscle for 18.3 s daily (automatically adjusted).

2.5 I.m. venom injection and laser irradiation

Soon after *B. moojeni* venom i.m. injection (40 µg/mL) in the right gastrocnemius muscle of anesthetized mice sodium pentobarbital (40-70 mg/ml, i.p.), the first irradiation session was targeted transcutaneously at the injection site. Animals sacrificed at 3 and 12 h p.i. were given a single irradiation session soon after venom injection, whereas to animals sacrificed at 24 h p.i. was given a second session 3 h before sacrifice. Animals sacrificed at 3, 7 and 21 days p.i. were given 4, 8 and 22 irradiation sessions (daily therapy always at the same time), respectively. For irradiation sessions, the mice were immobilized, and positioned on their side using a specially designed device. The right hind limb to be irradiated was extended and rotated outwards to facilitate a right incidence of the laser beam on the venom-injected area. Only the saline- and venom-injected mice groups which were irradiated were restrained and immobilized, the unirradiated groups were not (n = 5 per group and time interval).

The incident energy densities (He-Ne: 4 J/cm² and GaAs: 4 J/cm²) were chosen based on reports describing doses ranging from 1 to 4 J/cm² as more efficacious for regenerative processes (Mester 1985, Basford 1993, 1995). No other type of therapy, pharmacological or physical, was given to the animal during the experimental procedures.

2.6 Immunohistochemistry

The evaluation of the expression of the Flt-1 membrane receptor, a membrane receptor found in endothelial cells and high affinity for the vascular endothelial growth factor (VEGF-R1), was done through immunohistochemistry. Animals from all experimental groups were anesthetized with sodium pentobarbital (40-70 mg/ml, i.p.). After dissection from distal to its proximal tendinous insertion gastrocnemius was fixed in 4%

paraformaldehyde and embedded in paraffin. For histochemical analysis, cross sections from each sample (5 μm) were deparaffinized with xylene, dehydrated in ethanol series, washed in phosphate buffered saline (PBS) before reaction. After the sections were immersed in sodium citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) and incubated in microwave (high potency) oven for 3 cycles of 3 min each (Gown; Wever; Battifora, 1993). Endogenous peroxidase was blocked by incubation for 30 min in TBS containing 3% hydrogen peroxide at room temperature (RT). Non-specific binding was blocked by incubation with 1% BSA/TBS for 60 min at RT. After, sections were incubated with primary antibody rabbit Anti-Flt (1:100) overnight at 4°C. After a brief washing, amplification of the primary antibody signal reaction was achieved by incubating sections with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody for 60 min at RT. After a brief rinsing in avidin-biotin-HRP conjugate for 45 min at RT. All antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA. After washing the reaction was revealed by the substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) in a solution containing 2.25 ml TBS, 250 μl DAB plus 5 μl 30% H_2O_2 . The slides were rinsed in running water, counterstained with Harris's Hematoxylin for 45 s, differentiated in lithium carbonate saturated aqueous solution, washed in distilled water, dehydrated through ethanol series, cleared in xylene and finally mounted with Entelan (Merck). Negative controls were made excluding the primary antibody, i.e., using only 1% BSA in TBS. The immunohistochemical samples were analysed and digital images were captured using a computer program Image Pro Plus, version 4.1.1.2 for Windows 95/nt/98 1993-2001 Media Cybernetics, LB.

2.7 Morphometry

The immunolabeling of areas undergoing angiogenesis through the expression of the receptor for VEGF (Flt-1; VEGFR-1), enables the quantification of capillaries formation in the various experimental groups ($n = 5$ per group and time interval). Five fields chosen from five sections of each muscle sample from each animal were counted (25 fields/rat and 125 fields/treatment, i.e., 125 fields at each of the six time intervals of the S, V, VGA and VHN experimental groups). In all groups the counting of blood vessels always elected a

"Hot Spot" region that comprises the tissue field with higher density of vessels around the lesioned area. An Axiolab light microscope (Zeiss, objective 40 x) coupled to a video camera Sanyo Digital Active BLC connected to a video plaque equipped Pentium III 700 MHz was used for capturing the images.

2.8 Statistical Analysis

The comparison among the various experimental groups within each time interval regarding the mean number of immunolabeled vessels was done by one way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test. Same procedure was used for comparison of the number of blood vessels among the different time intervals (3, 12 and 24 h, 3, 7 and 21 days) in a given experimental group (Shott, 1990). The data were analyzed using the software SigmaStat, version 2.0, with a p value of 0.05 considered significant.

3. RESULTS

Number of capillaries

The counting of capillaries indicates that there was a significant reduction of their mean number in the region of gastrocnemius where the venom of *B. moojeni* was injected (Figs. 1 and 2). When a single irradiation is applied soon after venom injection any improvement was detected in relation to blood vessels neoformation (animals from VGA and VHN sacrificed at 3 and 12 h p.i.). However, two irradiation sessions caused a significant increase in the mean number of blood vessels of mice that had been injected with snake venom, being the action on vessel neoformation significantly higher with HeNe than with GaAs diode laser ($p < 0.001$). Three days p.i., the mean number of capillaries of the V group (unirradiated injected with venom) was lower than in saline group, and did not show difference in relation to 24 h p.i. This figure persisted practically unchanged until the end of observations at day 21 (Table 1, Figs. 1 and 2). However, the LLLT in which four irradiation sessions (HeNe: 4 J/cm² and GaAs: 4 J/cm² with a daily exposure of 120 s and 18.3 s, respectively) were administered transcutaneously at the site of injection induced a

marked increase of newly-formed capillaries ($p < 0.001$). The efficacy of HeNe persisted over GaAs in the longer periods.

Seven and 21 days p.i. (8 and 22 irradiation sessions, respectively), did not change significantly the number of capillaries that had been counted at day 3 p.i., maintaining though the significant rise in relation to the venom unirradiated animals. A significant superior efficacy was obtained with HeNe laser in comparison to GaAs laser ($p < 0.001$) (Table 1, Figs. 1 and 2).

VEGF expression

S group: The expression of angiogenic factors by immunolabeling using specific antibodies in saline-injected (S group) gastrocnemius was relatively scarce. It was more expressed at 3 h (a single laser session) than in later periods in which the number of irradiation sessions was daily, therefore as much as the days after saline injection. At 3 h, labeling of VEGF, although un conspicuous, was seen in nerves, in the three layers of small blood vessels, endothelial, muscle and connective cells, in tenocytes, and in skeletal muscle cells. The expression of VEGF decreased gradually with irradiation. At 3 days, VEGF expression was seen in some muscle and tenocytes nuclei (Fig. 1A-C).

V group vs VGA or VHN groups (unirradiated vs irradiated)

3 h - Among the neutrophilic inflammatory cells that migrate to region of the muscle that was injected with *B. moojeni* venom part of them exhibited VEGF activity (Fig. 2A). This activity was markedly enhanced by irradiation with HeNe (Fig. 2B). The nucleus of satellite-like cells was also VEGF-positive (Fig. 2C). Muscle cells cytoplasm was positive in V group (Fig. 2A), however the labeling was in general stronger in VHN group (Fig. 2C). The expression was uneven, i.e. there were muscle cells unlabeled, also the labeling preferentially occurred in small oxidative type-I-like cells (Fig. 2C). Inflammatory neutrophilic cells are either VEGF positive or negative with GaAs (Fig. 2D).

12 h - Muscle cells cytoplasm was positive only in the V group, but there were negative fibers for VEGF (Fig. 3A). The inflammatory infiltrate is larger at 12 h p.i., but neutrophils are in general VEGF-negatives, however in VHN groups precocious migratory

macrophages, whose nuclei were labeled with VEGF were seen (Figs. 3B,C). Endothelial cells (EC) and their nuclei were positive with HeNe and VGA (Fig. 3C,B).

24 h - The extension of inflammatory infiltrate was higher at this time interval, however whereas the inflammatory cells were strongly VEGF positive in VHN (Fig. 3B), they were discontinuously positive in V group, and practically negative in VGA (Fig. 3D). Muscle cells positive for VEGF was quite common on VHN group and in V group (Figs. 3A,B), whereas it was absent in VGA group (Fig. 3D). Microvasculature was less labeled in VGA group than in VHN and capillaries from tendons presented great number of granules intensely positive for VEGF (Fig. 3C). The V and VGA groups did not exhibit such feature.

3 d - The more prominent characteristic of this period refers to the appearance of regenerating VEGF-unlabeled myotubes, which were more abundant in gastrocnemius irradiated with GaAs (Figs. 4A,B,D). In this group, myotubes were well developed and higher in number than in the V and VHN groups. The regions of regeneration was permeated with labeled newly-formed blood vessels (Fig. 4A,C,D). Inflammatory cells although less labeled at this period in all of the three groups, exhibited stronger labeling in VHN in comparison to V and VGA. Degenerating cells show an amorphous degraded material in their interstices that was VEGF positive (Fig. 4B0).

7 d - V unirradiated group showed great number of regenerating cells, however VEGF expression was negative, unless for a weak positivity observed in nerves (Fig. 5A). VGA maintained the better development of regenerating cells in relation to VHN group, with numerous myotubes percolating the regenerating tissue region, which by their turn presented neoformed positive capillaries among the regenerating fibers (Figs. 5B-D). An interesting characteristic of VHN group was the presence of VEGF-reactive satellite-like cells around the regenerating fibers (Fig. 5C). Fibroblastic VEGF-positives cells were numerous in the adventitial layer of arterial vessels in VHN group (Fig. 5B). Both lasers also induced VEGF expression in tenocytes, in smooth muscle and adventitia layers of blood vessels, in neuromuscular spindle and in intramuscular nerve fascicle in the periods from 7 to 21 days p.i..

21 d - Venom unirradiated animals presented a high population of regenerating muscle cells, and the labeling is most localized in tendon cells (Fig. 6A). Some VHN myotubes

expressed VEGF in their nuclei and cytoplasm (Figs. 6B,C), whereas none VGA's did (Fig. 6D). VHN myotubes were poorer developed than VGA myotubes whose diameter was larger and striation was well-organized (Figs. 6C,D).

Saline Solution

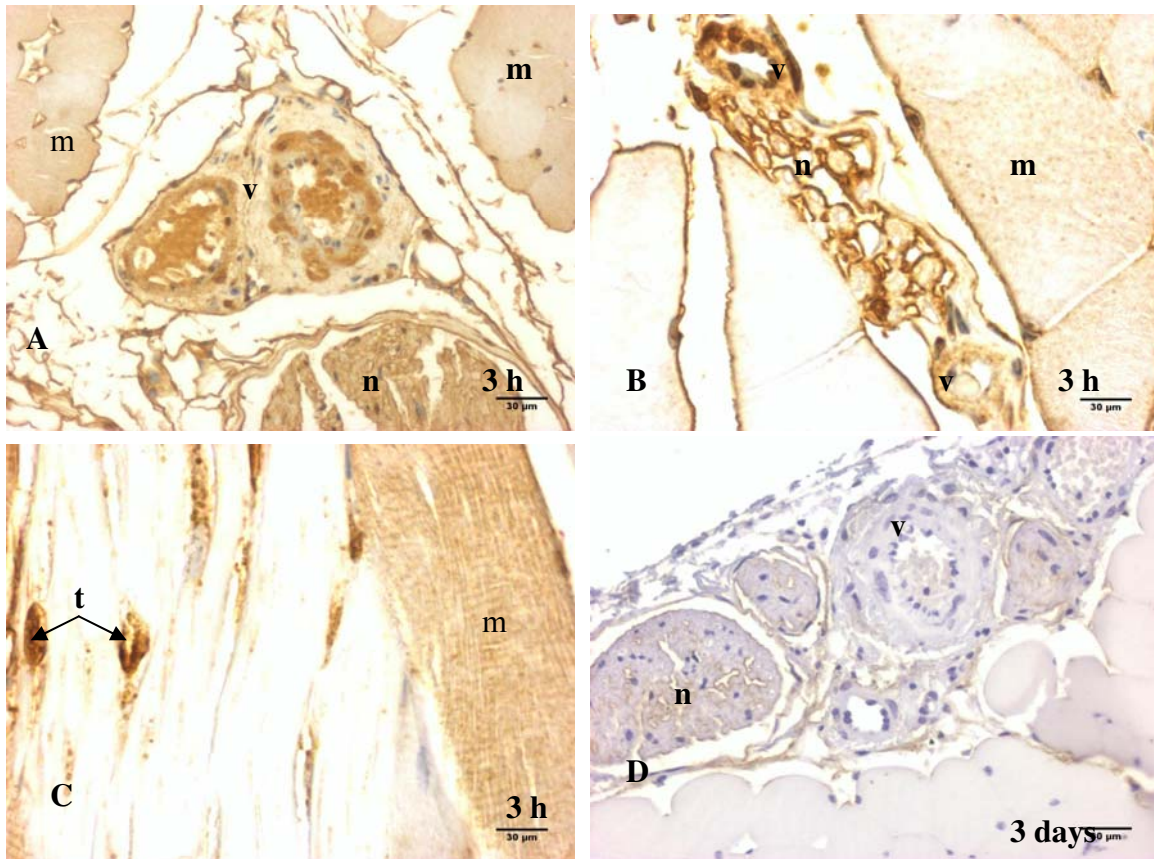


Figura 1 Light micrographs of saline injected muscle: VEGF expression in mouse gastrocnemius. A,B,C – 3 h p.i. Note that VEGF is expressed in smooth muscle cells of arterial blood vessel (v) and endothelial, in nerves (n), in nuclei and cytoplasm of skeletal cells (m), tenocytes (t) at 3 h p.i. D- 3 days p.i. VEGF is mostly negative in these structures. A,B,D, 200x and C, 600x.

3 hours

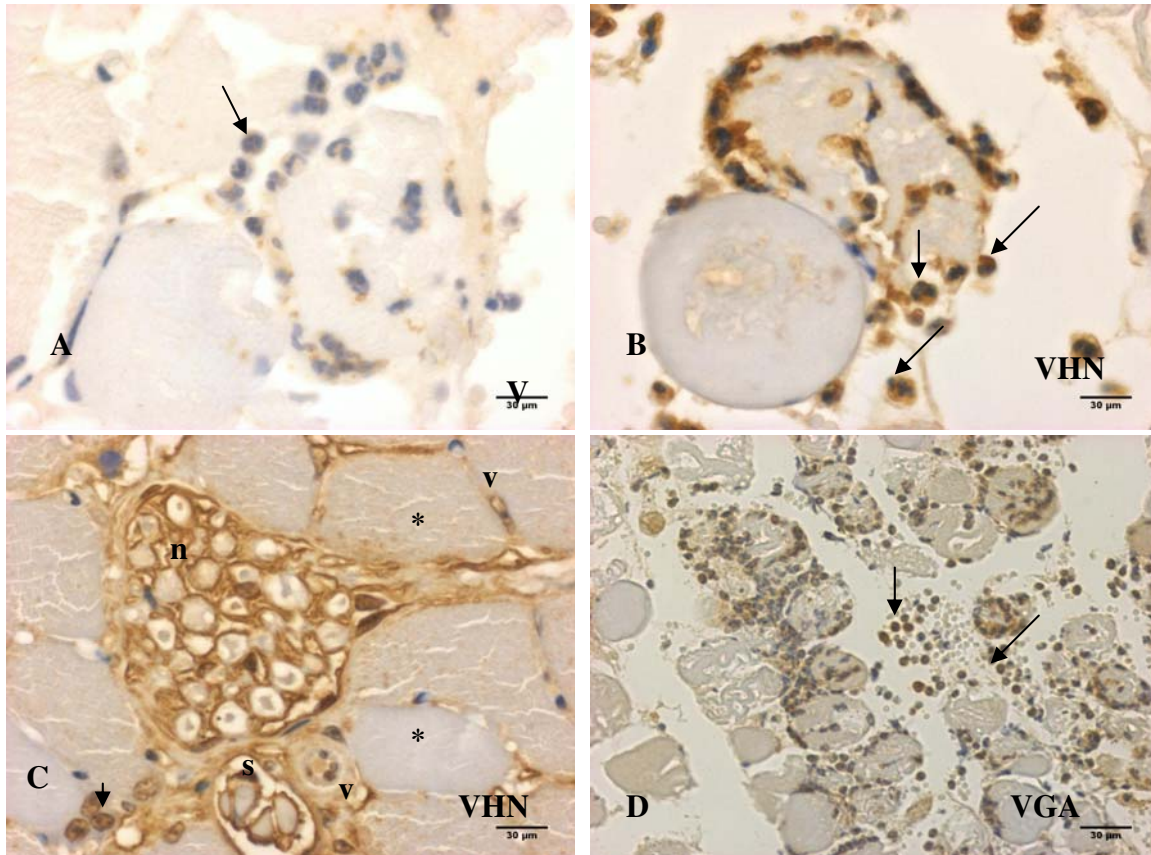


Figure 2 Light micrographs of gastrocnemius muscle injected with *B. moojeni* venom (40 µg/mL) and irradiated with HeNe or GaAs. Immunohistochemistry for VEGF: note VEGF expression in some neutrophils in V, and in all neutrophils in VHN group (arrows). Note also labeling in nerves (n), neuromuscular spindle (s), blood vessels (v), satellite-like cells (arrowheads) and endothelial cells (short arrows). Observe that some muscle cells are less labeled (*). A,B,C 600x and D 200x.

12 hours

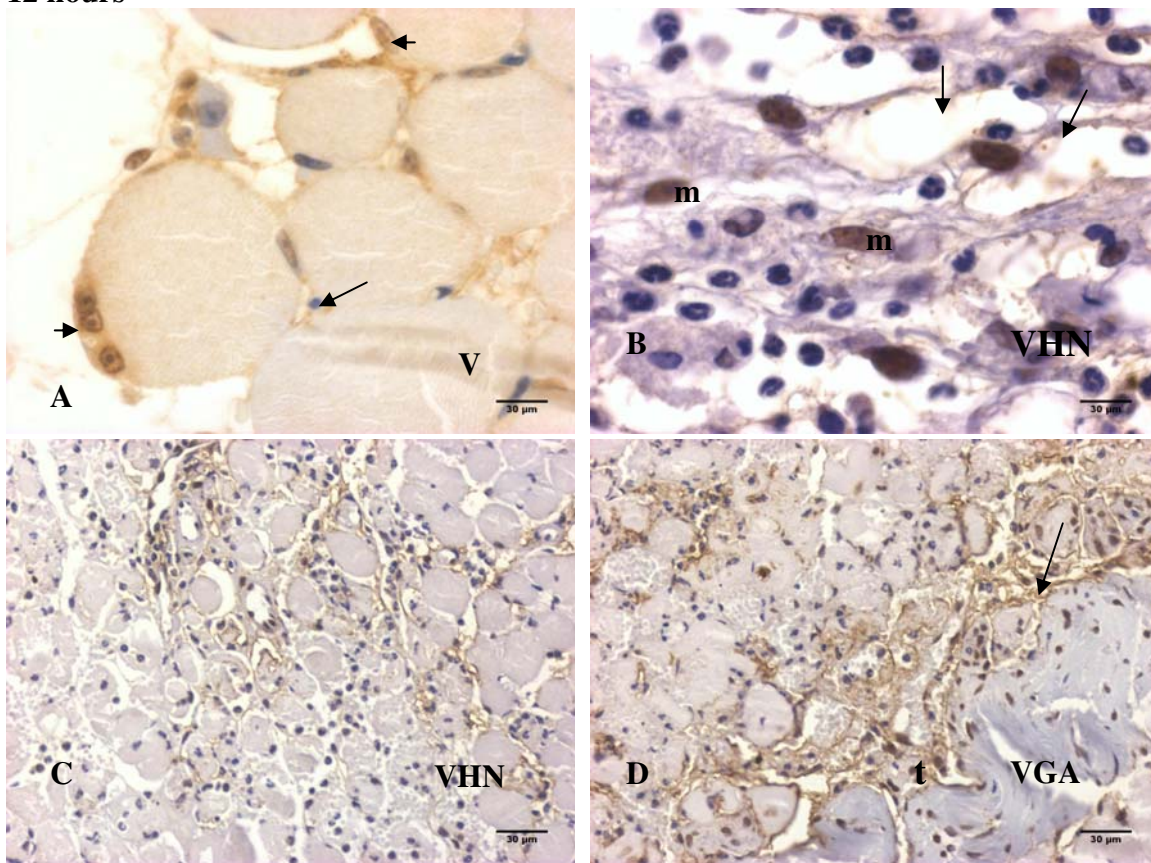


Figure 3 Cross-sections of unirradiated (A) and irradiated (B-D) gastrocnemius. Expression of VEGF is seen in satellite-like cells (arrowheads) in V group, in “precocious migratory macrophages” (m), in capillaries (arrows), in tenocytes (t) in VHN and VGA groups. Neutrophils are mainly VEGF negatives.(A,B) 600x and (C,D) 200x.

24 hours

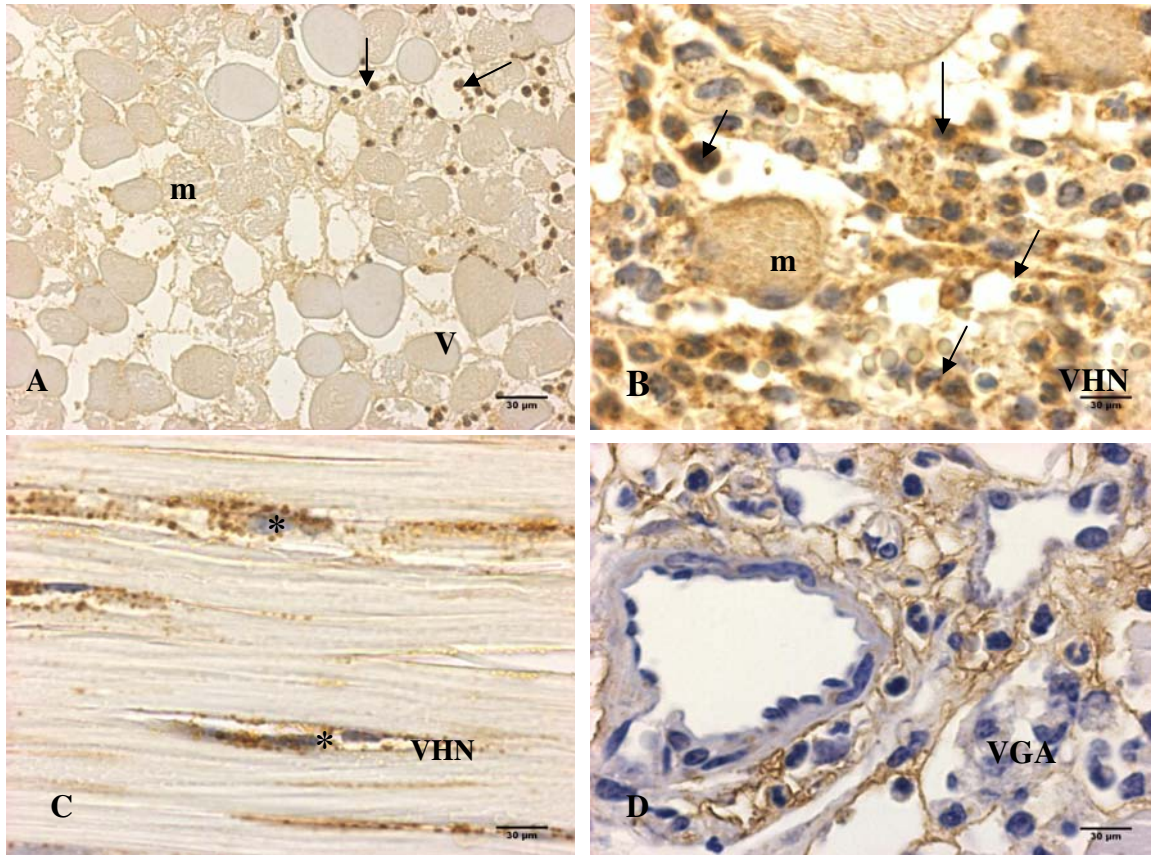


Figure 4 Immunohistochemistry of VEGF in gastrocnemius: note that neutrophils are strongly VEGF positives in V and VHN group (arrows) but is negative in VGA. Also, V and VHN show skeletal fibers expressing VEGF (m), but VGA is negative, although capillary endothelium is positive, whereas venule endothelium is negative. In C endothelial cells of tendon capillaries are also VEGF positive (*). A, 200x and B,C,D 600x.

3 days

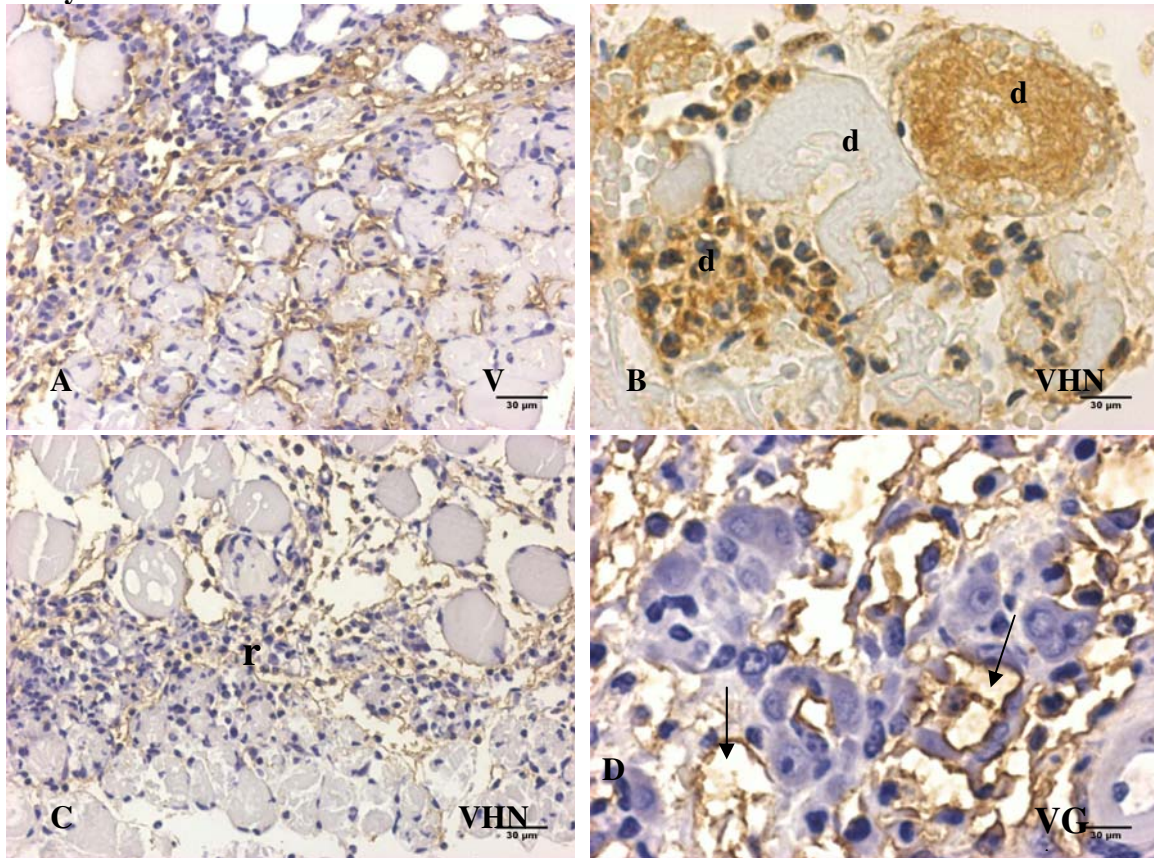


Figure 5 Immunolabeling of VEGF in mouse gastrocnemius. See areas of regeneration in unirradiated V group (A): Inflammatory cells are mostly unlabeled, but capillaries are strongly positives for VEGF. Irradiation with HeNe induces strong VEGF expression in the inflammatory cells and in the degenerating cells (d), seen in panel B. In C, it was shown a regenerative area (r) in the center of a population of myonecrotic fibers. Neoformation of capillaries are in progress. In D, regenerating muscle cells cluster (myoblasts) invaded by neoformed blood capillaries (arrows). A,C 200x and B,D 600x.

7 days

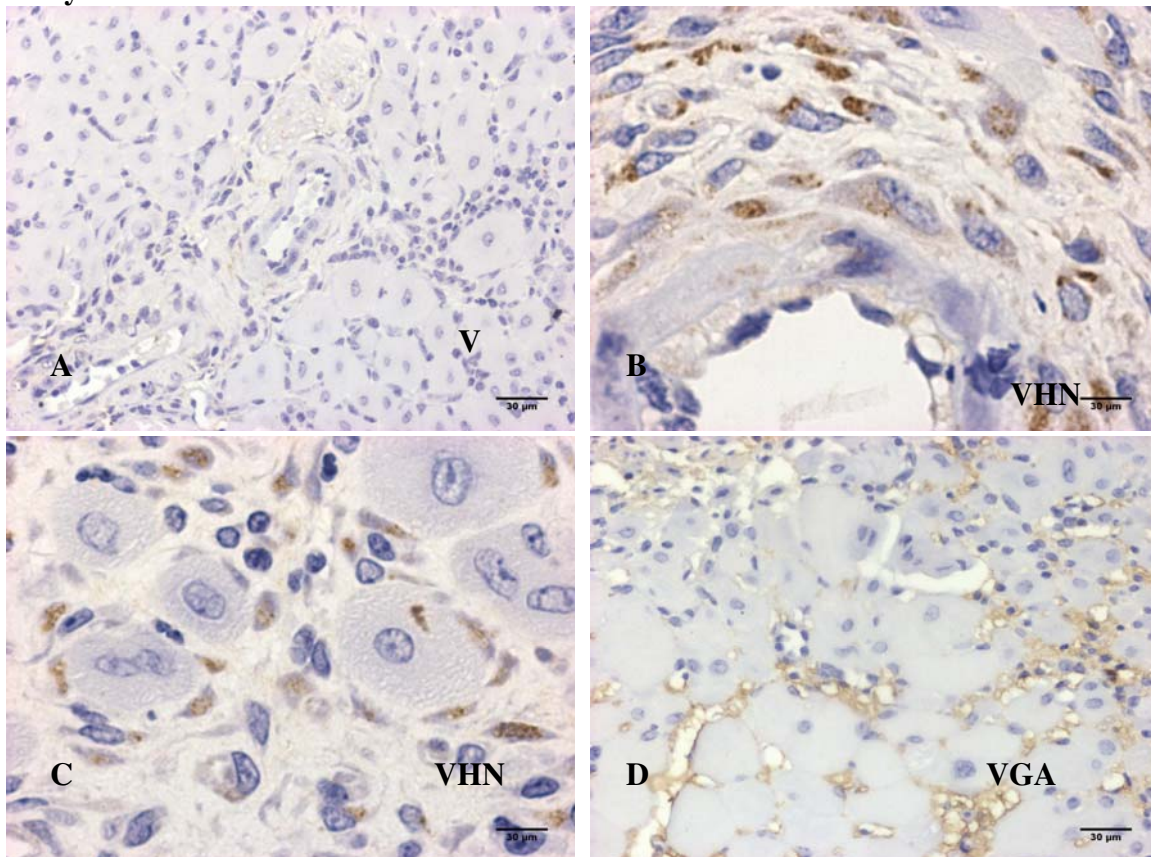


Figure 6 A) V group – note the well developed regenerative area showing numerous cross sectional myotubes: VEGF is absent; B) arterial wall showing positive smooth muscle cells and fibroblast of adventitia; C) regenerating cross sectional myotubes involved by VEGF positive satellite-like cells; D) VGA group: the labeling is seen in capillary endothelium (but some are negative for VEGF). A, D 200x and B, C 600x.

21 days

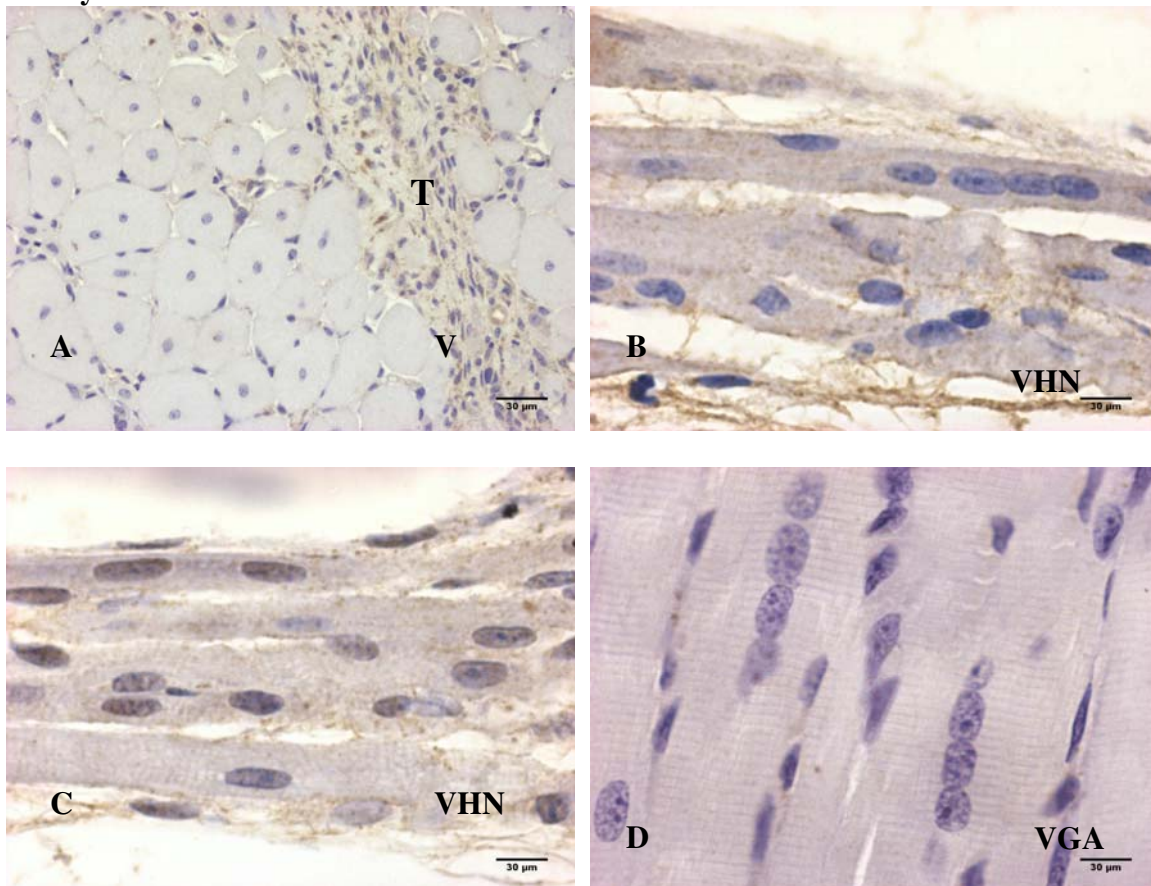


Figure 7 Light micrographs of gastrocnemius immunostained for VEGF. A) Cross-section of well developed regenerating muscle fibers. In the center a tendon (T) where VEGF positive cells are seen; B and C show longitudinal section of myotubes, whose nuclei and capillary network show VEGF expression; D – In comparison, myotubes of VGA group are well developed than those of VHN group. A, 200x and B,C,D 600x.

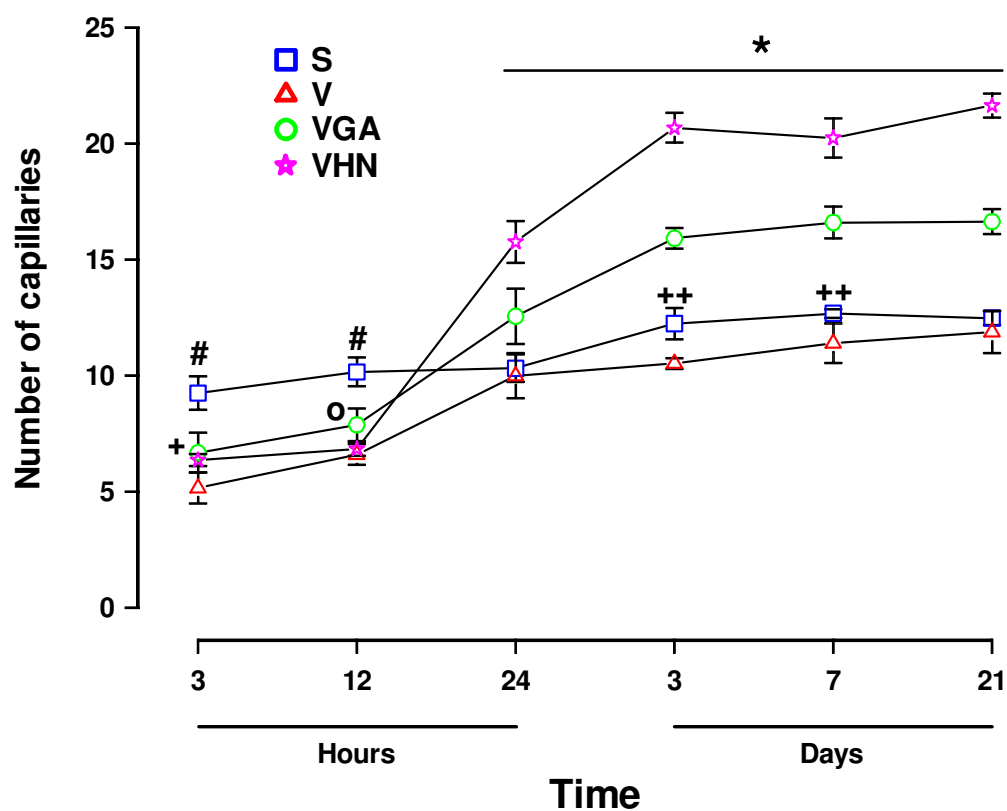


Figure 1: Mean $\pm$ S.E. (standard deviation) of the number of capillaries ($n = 125$) counted in cross-sectioned gastrocnemius of mice in four experimental groups at different time intervals: S – 0.9% Saline injection (i.m.); V – 40 $\mu\text{g/mL}$ of *B. moojeni* venom i.m. injection; VGA – mice injected with venom and irradiated with GaAs laser incident energy of 4 J/cm^2 and daily exposure of 18.3 s each); VHN – injected with venom and irradiated with HeNe laser (4 J/cm^2 and daily exposure of 120 s each).

4. Discussion

The immunohistochemical results showed that LLLT either enhances (HeNe) or inhibits (GaAs) the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mouse gastrocnemius injected with venom of *B. moojeni*. HeNe also enhances the expression of

VEGF in saline-injected muscle. The most conspicuous effect of HeNe irradiation was to increase the expression of VEGF in neutrophils (at 3 h, 24 h and 3 days), in skeletal muscle cells (3 and 24 h), in tendon capillaries (24 h) in satellite-like cells around myotubes, fibroblasts of adventitia of blood vessels (7 days), and myotubes nuclei (21 days). On the other hand, GaAs irradiation produced a well-organized architecture of the muscle tissue and a higher number and well-developed myotubes than those irradiated with HeNe. The results from morphometry showed that HeNe-irradiated gastrocnemius presented a significant higher number of neoformed capillaries. The findings suggest that there was not a direct correspondence between VEGF expression and progress of regeneration post injection, since HeNe enhanced the expression of the protein, but GaAs promoted better and apparently faster recovery of the tissue. If one supposes that the better restoration of the microvasculature (by HeNe) would promote a better blood perfusion of muscle and so adequate conditions for optimized muscle regeneration, that was not the case, since the better results seen by histological analysis, were obtained with GaAs laser irradiation.

In a same experimental model of mice, Dourado et al., (unpublished results a) observed that GaAs laser irradiation also promoted decreased serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) and blood myoglobin, whereas HeNe irradiation was less effective, and even at some extent was harmful, accentuating the venom-induced abnormal values of these markers. On the other hand, HeNe irradiation was able to accelerate angiogenesis in the gastrocnemius region affected by *B. moojeni* venom, as well as to enhance the expression of the vascular endothelial growth factor (Dourado et al. unpublished results b).

B. moojeni venom possesses high procoagulant, platelet pro-aggregating and phospholipase activities (Francischetti et al., 1998), induces hemorrhage (de Roodt et al., 2003) and intense skeletal myonecrosis of rapid onset, as demonstrated by histological observation and measurement of serum creatine kinase levels (Dourado et al., 2003). From venom was isolated a metalloproteinase known as *moojeni* protease a which accounts for 50% of hemorrhagic activity of the whole venom, and is 10 folds less hemorrhagic than bothropasin, a metalloenzyme from *B. jararaca* venom (Mandelbaum and Assakura, 1984; Assakura et al., 1985). Metalloproteinase hemorrhagic activity is responsible for degrading

several components of the extracellular matrix, such as fibronectin, collagen I, II, III, IV and V, gelatin, laminin and proteoglycans (Murphy et al., 1981), some of which are components of the basement membrane underlining endothelium. In addition, metalloproteases are potent inhibitors of platelet aggregation, are able to hydrolyze the basal lamina leading to formation of gaps in the endothelial wall which by their turn triggers endogenous amplifying mechanisms that leads to impaired basal lamina functionality (Moreira et al., 1994).

Recently, it was shown that BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *B. asper* venom, leads to anoikis, a form of apoptosis in cultured human endothelial cells (EA.hy926 cell line) (Díaz et al., 2005). Anoikis is a poorly-studied form of programmed cell death that occurs when cells loose their integrin-mediated attachment to extracellular matrix (Meredith et al., 1993; Grossman 2002). In recent studies we proposed that the venom of *B. moojeni* snakes has a direct nephrotoxic action for it acutely causes proximal and post-proximal tubule dysfunction in sodium handling that is associated with acute tubular necrosis, and a marked decrease of glomerular filtration rate (GFR), which is accompanied by severe morphological abnormalities of the filtration barrier including mesangiolysis, glomerular capillary microaneurysms, glomerular basement membrane (GBM) distortions, and reduction in the number and width of podocyte pedicels (Boer-Lima et al., 1999; 2002). In cultured renal tubular epithelium, the venom induced a significant time- and dose-dependent decrease in transepithelial electrical resistance across MDCK monolayers, a disarray of the cytoskeleton, specifically of the stress fibers and of the focal adhesion-associated F-actin at the cell-to-matrix contact region (Collares-Buzato et al., 2002). The treatment with *B. moojeni* venom also increased the cell release of lactate dehydrogenase and decreased cellular uptake of the vital neutral red. We concluded that *B. moojeni* crude venom could have a direct cytotoxic effect on a renal tubule-derived cell line, also inducing impairment of the cell to matrix interaction.

In this work, the increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in capillaries of envenomed muscle may have a role in the increased number of capillaries in the animals that received laser irradiation. VEGF, among other angiogenic factors, such as VEGF receptors, angiopoietins, ephrins, matrix metalloproteinases, and the plasminogen

enzymatic system, is the most critical factor because it initiates the formation of immature cells, and this is interpreted as a signal to attracting satellite cells within the muscle regenerating environment into which VEGF is released to act on muscle cells through a paracrine way (Germani et al., 2003). In the current study, we found degenerating cells and apparently normal cells expressing VEGF, mainly observed in animals that were irradiated with HeNe laser. On the other hand there are a number of studies indicating that low power HeNe laser irradiation enhances the expression of VEGF in murine myocardium (Zhang et al., 2004), stimulates production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells *in vitro* (Kipshidze et al., 2001), as well as increases the expression of proangiogenic genes in cardiomyocytes *in vitro* (Khanna et al., 1999).

In this study, it was shown that both the venom unirradiated animals as well as the envenomed irradiated with HeNe laser expressed VEGF in neutrophils that migrate to the lesion region, and that the expression was more expressive after HeNe treatment. It was also observed that GaAs irradiation markedly decreases VEGF expressed by these inflammatory cells. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are usually thought of as the leukocyte population involved in acute inflammatory responses, acting as a first line of defense against invading microorganisms. PMNs influx in the acute inflammatory response is associated with a local increase in vascular permeability and odema. VEGF is known to have potent vascular permeability-enhancing properties in addition to being an endothelial cell mitogen and a chemo-attractant for mononuclear cells (Webb et al., 1998) Neutrophils recently have been shown to produce VEGF (McCourt et al., 1999). The authors report that acute inflammatory response is a potent stimulus for neutrophils-directed angiogenesis, and that VEGF is one potent pro-angiogenic factor cytokine produced by these cells.

In conclusion, the findings of this study strongly suggest that low power laser irradiation can speed revascularization of muscles that underwent the myotoxic and vasculotoxic effects caused by bothropic venoms.

5. REFERENCES

- Assakura, M.T., Reichl, A.P., Asperti, M.C.A., Mandelbaum, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, 23:691-706, 1985.
- Banai, S., Shweiki, D., Pinson, A., Chandra, M., Lazarovici, G., Keshet, E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. **Cardiovasc Res.**, 28:1176-1179, 1994.
- Basford, J.R. Laser Therapy: Scientific Basis and Clinical Role. **Orthopedics**, 16:541-547, 1993.
- Basford, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med.** 16:331-342, 1995.
- Gown, A.M., Wever, N., Battifora, H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry**. 256-66, 1999.
- Bibikova, A, Oron U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat. Rec.** 241:123-128, 1995.
- Bibikova, A, Belkin, V, Oron, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy irradiation. **Anat. Embryol.** 190:597-602, 1994.
- Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A., Cruz-Höfling, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61:698-706, 1999.

Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A., Cruz-Höfling, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 67: 217-222, 2002.

Collares-Buzato, C.B., de Paula Le Sueur, L., Cruz-Höfling, M.A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol Appl Pharmacol.** 181: 124-132, 2002.

Colls, J. La terapia Laser Hoy. Barcelona, Centro de Documentación Láser de Meditec, 1984.

Cruz-Höfling, M.A., Cogo, J.C., Rodrigues-Simioni, L. Vascular changes induced by *Bothrops insularis* venom. Abstract. In: Annals of the IV Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, in honour of Vital Brazil, Campinas, SP, pp 129, 1992.

Da Silva, O.A., Lopes, M., Godoy, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 28:401-407, 1979.

de Roodt, A.R., Litwin, S., Vidal, J.C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. **Toxicon** 41: 949-958, 2003.

Dourado, D.M., Favero, S., Baranauskas, V., Cruz-Höfling, M.A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers Surg Med.** 33:352-357, 2003.

Enwemeka, C.S. Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He-Ne laser beam. **Tissue Cell** 42:511-523, 1992.

Francischetti, I.M., Castro, H.C., Zingali, R.B., Carlini, C.R., Guimaraes, J.A. *Bothrops sp.* snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol** 119: 21-29, 1998.

Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B., Elder, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon** 22: 85-98, 1984.

Greco, M., Guida, G., Perlino, E., Marra, E., Quagliariello, E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun.** 29;163 (3):1428-34, 1989.

Grosskreutz, C.L., Anand-Apte, B., Duplaa, C., Quinn, T.P., Terman, B.I., Zetter, B., D'Amore, P.A. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. **Microvasc Res.** 58:128-136, 1999.

Grossman, J. Molecular mechanisms of detachment-induced apoptosis-anoikis. **Apoptosis** 7:247-260, 2002.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33: 1405-1424, 1995.

Hati, R., Mitra, P., Sarker, S., Bhattacharyya, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit Rev Toxicol.** 29: 1-19, 1999.

Herrero, C. Los efectos terapeuticos. Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec. N. 15/16, p. 22-26, 1988.

Jorge, M.T, Ribeiro, L.A., O'Connell, J.L. Prognostic factors for amputatuion in the case of envenoming by snakes of the genus *Bothrops* (Viperidae). **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 93:401-408, 1999.

Khanna, A., Shankar, L.R., Keelan, M.H., Kornowski, R., Leon, M., Moses, J., Kipshidze, N. Augmentation of the expression of proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. **Cardiovasc Radiat Med.** 1:265-269, 1999.

Kipshidze, N., Nikolaychik, V., Keelan, M.H., Shankar, L.R., Khanna, A., Kornowski, R., Leon, M., Moses, J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells *in vitro*. **Lasers Surg Med.** 28:355-364, 2001.

Kubota, Y, Kleinman, HK, Martin, GR, Lawley, TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. **J. Cell Biol.**, 107, 1589-1598, 1988.

Mandelbaum, F.R., Assakura, M.T., Reichl, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwied* (jararaca pintada). **Toxicon**, 22:193-206, 1984.

McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. **Arch Surg.**, 134: 1325-1331, 1999.

Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. **Sci. STKE** 112: 1-17, 2001.

Meredith Jr., J.E., Fazeli, B., Schwartz, M.A., The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.** 4:953-961, 1993.

Mester, E., Mester, A.F., Mester, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.** 5:31-39, 1985.

Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon** 32: 977-987, 1994.

Morimoto, Y., Arai, T., Kikuchi, M., Nakajima, S., Nakamura, H. Effect of low intensity Argon laser irradiation on mitochondria respiration. **Lasers Surg. Med.** 15:191-199, 1994.

Moura-da-Silva, A.M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** 22:85-98, 1991.

Murphy, G., Cawston, T.E., Galloway, W.A., Barnes, M.J., Bunning, R.A., Mercer, E., Reynolds, J.J., Burgeson, R.E. Metalloproteinases from rabbit bone culture medium degrade types IV and V collagens, laminin and fibronectin. **Biochem J.** 199: 807-811, 1991.

Ownby C.L., Geren C.R. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. **Toxicon** 25: 517-526, 1987.

Queiroz, S.L., Santo Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Franceschi, J.P. Muscle necrosis and regeneration after *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon** 22:339-346, 1984.

Queiroz, S.L., Marques, M.J., Santo Neto, H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon.** 40: 1483-1489, 2002.

Passarella, S., Ostuni, A., Atlante, A., Quagliariello, E. Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. **Biochem Biophys Res Commun.** 31;156:978-86, 1988.

Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., Enwemeka, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg. Med.** 22, 281-287, 1998.

Rochkind, S., Nissan, M., Alon, M. Shamir, M., Salame, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers Surg. Med.** 28: 216-219, 2001.

Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F.P., Fernández, C.M., Díaz, C., Gutiérrez, J.M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm** 11: 121-128, 2002.

Salate AC, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. **Photomed. Laser Surg.** 23: 470-475, 2005.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.** 111: 525-532, 1997.

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. **J Cell Sci.** 115: 1461-1469, 2002.

Schindl, A., Schindl, M., Schindl, L., Jurecka, W., Honigsmann, H., Breier, F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic radiation ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.** 40: 481-484, 1999.

Shott, S. Statistics for Health Professionals. W.B. Saunders Company: London, 1990.

Trelles, M.A., Mayayo, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg. Med.** 7: 36-45, 1997.

Veçoso, M.C. Laser em Fisioterapia. Lovise: São Paulo; 1993.

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem.** 269: 26988-26995, 1994.

Webb NJ, Myers CR, Watson CJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). **Cytokine**, 10: 254-257, 1998.

Yu, W., McGown, M., Ippolito, K., Lanzafame, R.J. Photostimulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem. Photobiol.** 66: 866-871, 1997.

Zhang, W.G., Wu, C.Y., Pan, W.X., Tian, L., Xia, J.L. Low-power Helium-Neon laser irradiation enhances the expression of VEGF in murine myocardium. **Chin Med J (Engl).** 117: 1476-1480, 2004.

ABSTRACT

The study of natural substances aims not only characterization of its active principles and biological effects, but also the comprehension of pathophysiologic phenomena that frequently are reproduced experimentally by these substances. Among these substances, snake venoms deserve special importance for the richness of pharmacologically active components and the frequency of accidents caused by venomous snake bites, particularly abundant in tropical countries. In Brazil these accidents acquires relevance in terms of public health because they may cause severe systemic and local alterations, being the *Bothrops* genus responsible for 90% of them. In this work, the pathologic local and systemic alterations induced by the intramuscular (i.m.) injection of *Bothrops moojeni* venom (40 µg/mL, 0.1 ml/100 g of animal weight) in mice were studied histologically, by capillary counting, immunolabeling of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in the gatrocnemius and by the changes of creatinekinase (CK), acid phosphatase (AcPase), alkaline phosphatase (AlkPase), lactic acid desidrogenase (LDH), transaminase oxaloacética (TGO) and mioglobin serum levels at 3, 12, 24 hours, 3, 7 and 21 days (n = 5/period) after envenoming. The effects of protocols of irradiation using low potency lasers, HeNe (632.8 nm) and GaAs diode (904 nm), both with a energy density of 4 J/cm⁻², on these parameters were evaluated. The first section of irradiation was administered soon after the i.m. injection of venom and then at each 24 h interval, in such a way that the number of irradiations done were one, one, two, 4, 8 and 22, respectively, applied perpendicularly right at the injection site during 120 s (HeNe) and 18.3 s (GaAs) duration for each session. For determination of LDH, TGO and mioglobin, a zero time without irradiation was added. The results were compared with control animals, injected with sterile saline (0.9%). Morphologically, the venom produced a immediate series of changes, the quality of which were similar from 3 to 24 h p.i., but with a progressive number of myonecrotic fibers and inflammatory infiltrate. The regenerative phase starting at day 3, showed a crescent number of regenerating and decreasing number of degenerated fibers with polymorphonuclear cells being replaced by macrophages. Histolgically, HeNe

irradiation attenuated the first stages of degeneration (3 h), but GaAs's was more effective considering the whole period of observations (21 d), leading to the presence of higher number of myotubes and better cytoarchitecture of the tissue. The counting of capillaries at the site and periphery of lesion showed that the venom-injected unirradiated mice had a decrease in the average number of capillaries, and that laser irradiation accelerated the neovascularization, being HeNe more efficient than GaAs. The results also showed that VEGF and its receptors were expressed in a parcel of neutrophils, in sparse satellite cells in the initial periods of the envenoming (3 – 24 h), in capillaries of the periphery of lesion and in the middle of the degenerating fibers. The irradiation with HeNe induced enhancement of VEGF expression in the neutrophils, but the GaAs abolished it. HeNe also promoted VEGF expression in the tendon capillaries and intact skeletal muscles. At 7 d p.i., VEGF-labeled fibroblast-like cells were seen in the regenerative region, as well as "satellite"-like cells around developing myotubes after irradiation with HeNe. The irradiation by both lasers also induced VEGF positivity in tenocytes, in smooth muscle cells of blood vessels, in adventitia layer, in neuromuscular spindle and in the interstices of intramuscular nerves in the periods from 7 to 21 days p.i.. The results from serum enzymes showed that HeNe irradiation reduced markedly CK activity from 3 h to 7 days, whereas GaAs reduced it from 12 h to 21 days p.i.. AcPase activity increased dramatically at 12 h p.i. after which there was decline, which was more accentuated with laser GaAs. HeNe irradiation induced a gradual increase of AlkPase activity until 24 h p.i., followed by decrease, whereas GaAs caused an extraordinary increase between 12-24 h, maintaining a significant difference in comparison to the venom unirradiated mice. The irradiation with HeNe was not efficient in decrease the LDH levels; on the contrary, it was deleterious, elevating their levels. Conversely, the irradiation with GaAs was efficient in decrease significantly the enzyme levels during all observed periods. In regard to TGO, the irradiation with HeNe was efficient in diminishing the enzyme levels in the initial 3 h p.i., after which it was deleterious. On the other hand, irradiation with GaAs was not effective in minimizing AST serum levels, except at day 7 when there was a significant 16.6% reduction. The high myoglobin serum levels induced by *B. moojen* venom, significantly declined with GaAs from 12 h to 7 d p.i., while HeNe irradiation showed efficacy between 3-7 days p.i. The

group of mice injected (I.m.) with sterile saline did not show any significant difference in all periods analyzed for these parameters. We conclude that therapy with low potency laser applied locally is capable of alter the serum content of muscle damage biomarkers (CK and myoglobin), as well markers of systemic alterations. The photostimulation promoted by low energy laser irradiation can alter favorably markers of local and systemic alterations caused by *Bothrops moojeni* snake envenoming, suggesting this approach as a promising resource for recovery of affected muscle as well as in the resulting systemic disturbances.

Key-words: *B. moojeni*, CK, seric enzymes, morphometry, VEGF, laser irradiation

TRABALHO PUBLICADO

Effects of the Ga-As Laser Irradiation on Myonecrosis Caused by *Bothrops moojeni* Snake Venom

Doroty M. Dourado, MSc,^{1,2} Silvio Fávero, PhD,² Vitor Baranauskas, PhD,³ and Maria Alice da Cruz-Höfling, PhD^{1*}

¹Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, C.P. 6109, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13 083-970 Campinas, Sao Paulo, Brazil

²Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, UNIDERP, Campo Grande, MS, Brazil

³DSIF-FEEC (UNICAMP), 13 083-970 Campinas, Sao Paulo, Brazil

Background and Objectives: Viper snake envenoming induces in the victims systemic coagulopathy, and severe local tissue damage such as edema, hemorrhage, intense pain, and myonecrosis. Serumtherapy and other first-aid managements are ineffective in neutralizing these local effects. The effects of the gallium-arsenide (Ga-As) laser irradiation on mice gastrocnemius injected intramuscularly (i.m.) with *Bothrops moojeni* snake venom were investigated.

Study Design/Materials and Methods: Macroscopical, histopatological, and myonecrosis quantification through serum creatine kinase (CK) evaluation was done at 3, 12, and 24 hours (two, five, and eight irradiation sessions, 4 J/cm², 1 minute 32 seconds per period, respectively), were done after the venom or saline injection, and in venom-unirradiated mice.

Results: In unirradiated gastrocnemius, the venom induced massive hemorrhage, vascular congestion, time-progressing myonecrosis, edema, abundant inflammatory infiltrate, and high CK serum levels. Ga-As irradiation significantly decreased the amount of myonecrosis in all the periods tested ($P < 0.05$).

Conclusions: The laser treatment significantly inhibited the ability of *B. moojeni* venom to rapidly disrupt the integrity of the plasma membrane. Lasers Surg. Med. 33:352–357, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

Key words: laser biostimulation; Lys-49 myotoxin; skeletal muscle; snake venom; *Bothrops moojeni*

INTRODUCTION

Accidents caused by venomous snakes are a health problem, particularly in tropical regions throughout the world. Venoms are complex mixtures of toxic bioactive compounds that have a variety of biological activities, either acting synergistically or antagonistically. In Brazil, the genus *Bothrops* is responsible for almost 90% of the accidents [1]. Although the lethality of the bothropic snakebite is considered low (0.35%), the morbidity is high due to the marked casuistic of the accidents, problems related to long-lasting immobilization, and severe local complications. At the site of the bite, a complex set of pathological alterations develops rapidly, to which serum

therapy has been shown to be highly ineffective, therefore often resulting in sequelae of difficult resolution [2–5]. The local effects comprises myonecrosis, skin necrosis, edema, blistering, hemorrhage, and other associated inflammatory reactions largely due to locally acting venom proteins and peptides [6,7], among which the metalloproteinases, known to play a prominent role in the pathogenesis of the local damage [8–11]. Metalloproteinases are hemorrhagic factors isolated from *Bothrops* venoms that cause hemorrhage followed by myonecrosis and arterial necrosis [8], hence potentiating the myotoxicity, as a consequence of a reduced muscle perfusion. Circulatory deprivation also affects muscle regeneration [8,11]. In addition, snakebite may be complicated with bacteria infections [12]. The efficacy of antivenom in the neutralization and clearance of venom antigens depends on numerous factors, including the potency of the antivenom, the time after bite and route of administration. However, serum therapy more likely neutralizes systemic envenoming in human accidents, but contributes little to control the rapid and severe local damage [13]. Although constriction band use can be helpful, tourniquets, incision and suction, and ice therapy are contraindicated. Electric-shock therapy is of no use and could cause serious injury [14]. Such picture supports the need of looking for successful approach to snakebite management.

For a long time, there has been a need to investigate the local effects of snake venom because it is a very relevant health problem. While much progress has been made in treating systemic effects of snake venoms and determining the composition of venom and its biochemical and molecular processes, treatments for local damage have developed more slowly, mainly due to the difficulty in finding ways to neutralize the effects of envenoming. For these

Contract grant sponsor: FAPESP; Contract grant sponsor: CNPq; Contract grant sponsor: FAEP-UNICAMP.

*Correspondence to: Maria Alice da Cruz-Höfling, PhD, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, C.P. 6109, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13 083-970 Campinas, Sao Paulo, Brazil.

E-mail: hofling@unicamp.br

Accepted 23 September 2003

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/lsm.10237

reasons, we decided to investigate alternative methods that could help minimize the complex local syndrome effects of snakebite victims.

The purpose of this work was to investigate whether laser irradiation applied locally following a bite-mimicking snake venom injection (intramuscular (i.m.)) could be a more efficacious first-aid alternative to minimize local effects. Since low-laser energy irradiation has shown to have positive effects on collagen synthesis, fibroblast proliferation, angiogenesis, skeletal fibers regeneration, and activation of ATP synthesis, it was hypothesized that the laser irradiation following the i.m. injection of *B. moojeni* snake venom would inhibit the severity of tissue damage.

MATERIALS AND METHODS

Venom and Animals

Venom was harvested from *B. moojeni* snakes captured in Pantanal region (Mato Grosso do Sul State, Brazil) and kept in the Zoology Lab. of UNIDERP-Campo Grande, MS. The venom sample was dehydrated, lyophilized, and stored at -20°C .

In this work, 27 male Swiss mice (20–40 g) from the University's Animal House were used. The animals were kept in plastic cages with food and water ad libitum in proper environmental conditions. All procedures with animals were carried out according the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) guidelines.

Experimental Protocol

Three experimental groups were used: control group injected with 0.9% sterile saline solution (A); group injected with venom solution (B); and group injected with venom solution and irradiated with GaAs laser (C), (0.1 ml/100 g body weight for all groups). The time allowed for the sacrifice of the animals were the same for A, B, and C groups: 3, 12, and 24 hours. Venom and saline inoculation was i.m. straight in the belly of the right gastrocnemius muscle, after local antisepsis and trichotomy. The venom concentration used was 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.4 mg/kg) diluted at the moment of use in sterile saline solution.

Surgical Procedure and Laser Radiation

The experiments were done using 27 young adult male Swiss mice. A low-energy Ga-As laser with a $\lambda = 904\text{ nm}$ (invisible), a selected peak potency of 45 W and spot size of 0.0176 cm^2 was delivered by a model LIVM 904 apparatus (KLD Biosistemas Equip. Eletr. Ltd., Amparo, SP, Brazil). The irradiation was targeted transcutaneously at the injury site (1 cm from the source), and kept perpendicular (90°) to the irradiated surface. Each irradiation session lasted 62 seconds (automatically adjusted) to deliver a total daily surface energy of 0.04 J (incident energy density dosage of $4\text{ J}/\text{cm}^2$). This dose was low enough to avoid putative thermal effects. The mice were immobilized with adhesive tape and positioned on their side. The right hind limb to be treated was extended and rotated outwards, to facilitate access of the laser beam. Irradiation was started

immediately after venom inoculation and again 3 hours, after which the mice were killed. Mice sacrificed at 12 hours after venom injection received five sessions of laser therapy (at 0, 3, 6, and 12 hours), whereas those mice sacrificed 24 hours after venom received eight sessions of laser therapy (0, 3, 6, 12, 15, 18, 21, and 24 hours). Only the irradiated venom-injected mice were restrained and immobilized for each irradiation sequence. The groups of un-irradiated mice (saline- and venom-injected) were not. In each group (A–C), three animals were used at each time interval.

Morphological Studies

At 3, 12, and 24 hours, each group of mice (irradiated envenomed, unirradiated envenomed, and control) was anesthetized (i.p.) with 40–70 mg/kg sodium pentobarbital. The gastrocnemius was collected for histological processing, after which the mice were killed with an overdose of anesthetics. The muscle samples were collected always with the injured hemorrhagic muscle tissue in the middle and 1–1.5 mm of surrounding tissue. After rinsing with phosphate-buffered saline, the samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, rinsed again, dehydrated in graded ethanol series, and embedded in paraffin. Histological cross sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome (TM).

Serum Creatine Kinase (CK) Activity

Determination of myonecrosis was assessed by quantification of serum CK. Groups A, B, and C (see above), of $n = 3$ mice/group, were injected i.m. in the right gastrocnemius with the saline (A) or venom solution (B,C), the latter with Ga-As irradiation. At 3 hours with two Ga-As laser irradiation sessions, 12 hours with five laser sessions, and 24 hours with eight laser sessions, blood samples were collected by cardiac puncture into heparinized capillary tubes. Immediately after blood sampling, it was centrifuged (2,000 rpm/25 minutes) for serum separation and colorimetric determination of CK activity (CK-NAK kit, Wiener Lab, Rosario, Argentina). The serum CK (EC 2.7.3.2) activity was expressed in units/liter (U/l), with one unit of activity causing the phosphorylation of one micromole of creatine per minute, at 25°C .

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The significance of any difference observed was determined by a two-way ANOVA test (for multiple comparisons) (comparison of the treatment and periods of irradiation) [15], with a $P < 0.05$ being considered significant.

RESULTS

Macroscopically, control muscle looked normal in all periods. The venom-injected, unirradiated muscle exhibited an edematous, dark hemorrhagic appearance, whereas in the irradiated ones, both characteristics were visibly attenuated.

Saline-injected gastrocnemius was histologically normal in aspect. Muscle fibers exhibited visible cross striations

and were juxtaposed into well-organized fascicles, whose perimysium did not show any evidence of hemorrhage or inflammatory cells invasion.

At 3 hours after *B. moojeni* venom injection (40 µg/ml), there were areas of massive hemorrhage in the middle of which swollen muscle fibers were scattered. Other affected fibers exhibited various pathologic states, including some with delta lesions, others punctuated with clear vacuoles, and several presenting tortuous masses of densely clumped myofibrils immersed in a lightly stained cytoplasm (Fig. 1A). The presence of a number of "ghost cells," devoid of any visible structure, was probably the final pathological state of the necrotic process of the fibers. In addition, interstitial edema, vascular congestion, and a discrete neutrophil infiltrate were observed. Quantification of the myonecrosis by serum CK levels showed a marked serum level of the enzyme, therefore a strong indication that venom induced rupture of the sarcolemma in a great number of cells compared to saline controls ($P < 0.05$) (Fig. 2).

At 12 hours after *B. moojeni* venom inoculation, the myonecrotic area increased by about 90%, compared to 3 hours, corroborating the significant increase of CK levels (Fig. 2). Although a great number of fibers showed similar pathologic states, as described at 3 hours, several others exhibited a more fragmented mass of condensed myofibrils. Neutrophils were abundant in the endomysium, just where degradation of fibers was intense (Fig. 1C). At 24 hours, the extension of the damaged area was essentially the same as that of 12 hours. Nevertheless, there was a remarkable decrease of CK activity in comparison to that at 12 hours (Fig. 2). At this time, blood vessels were less congested, areas of hemorrhage slowed down, and neutrophils were seen in the interstitium and within the necrotic fibers (Fig. 1E).

The venom group of mice treated with two, five, and eight sessions of Ga-As irradiation and killed at 3, 12, and 24 hours (Group C), respectively, showed some differences in the necrotic picture in relation to unirradiated envenomed mice (Group B). The area extension of hemorrhage had decreased in all three experimental periods (Fig. 1B,D,F). Neutrophil infiltration was more intense at 12 hours after venom injection (Fig. 1B), and the amount of activated macrophages seemed to be higher at 24 hours (Fig. 1F). A qualitative estimate of the damaged area in irradiated mice showed a moderate decrease of damaged fibers in all experimental periods in comparison to unirradiated ones. The quantification of myonecrosis assessed by measurements of serum CK activity corroborated the morphological analysis, since there was a significant decrease in the CK serum levels in Ga-As laser irradiated (4 J/cm²) mice in all periods (Fig. 2). Interestingly, while in unirradiated mice, the level of CK increased significantly from 3 to 12 hours, in irradiated mice there was a significant gradual and continuous fall until 24 hours, when the levels of the enzyme activity were close to those of saline controls. Comparisons of the serum CK activity, among the treatments (saline, venom, and venom + laser), and within each time interval,

showed that treatment significantly interfered with the enzyme activity.

DISCUSSION

The results presented in this study support the hypothesis that the low-power laser irradiation was able to decrease the fast-setting local effects, which prominently contribute to the severity of bothropic envenoming. It was found that the highest amount of myonecrosis in unirradiated venom-injected mice was at 12 hours, after which there was a fall of about 74% in the CK activity. This means that by 12 hours, the majority of muscle fibers had their sarcolemma ruptured. When Ga-As laser irradiation was applied to the injured site, the amount of myonecrosis at 12 hours was reduced by 50% in relation to the amount seen without laser treatment. This inhibitory laser effect on the CK fiber release was also seen at 24 hours, at which a 50% decrease in the CK activity was also maintained in relation to unirradiated mice. The statistical analysis indicates that time and treatment are independent factors, which means that no synergism exists between the two in the muscle response. The CK biochemical data are consistent with the morphological findings, since the pathogenesis of myonecrosis showed a smaller amount of fibers with delta lesions, hypercontraction, and clumping of myofilaments (pathological conditions that were indicative of disruption of plasma membrane) in the laser-treated mice at 24 hours. The results suggest that the laser irradiation significantly blocked the high ability of *B. moojeni* venom to quickly disrupt the integrity of plasma membrane. The venom possesses a Lys-49 phospholipase A₂ (PLA₂) class II myotoxin, where an aspartic acid at position 49 has been replaced by a lysine residue, giving the enzyme none or very low catalytic activity [16]. Despite being devoid of catalytic activity against phospholipids, Lys-49 PLA₂ demonstrates powerful membrane-damaging activity, via a Ca²⁺-independent hydrolytic mechanism, capable of causing a profound disturbance of the phospholipids bilayer of the sarcolemma. [17–19]. The exact mechanism by which Lys-49 PLA₂ interacts with the skeletal muscle cell plasma membrane is unknown. It is possible that a modification of the molecule structure (of the venom PLA₂ and/or of the phospholipids) is elicited by the laser energy density, in the form of light, and this could be the reason for the decreased amount of myonecrosis seen in this experimental model.

Other components of *B. moojeni* snake venom are coagulant enzymes [20,21], platelet-aggregating proteinases [22], fibrinogenolytic proteins (metalloproteinases) [23,24], inhibitory thrombin-induced platelet aggregation proteins [25], and myotoxins with PLA₂ structure without enzyme activity [26]. These toxins could profoundly impair the tissue perfusion and evoke an inflammatory response secondary to ischemic conditions, which taken together would contribute to the severe dermonecrotic and myonecrotic local effects. An attractive hypothesis, which needs to be substantiated, is the putative influence of the laser incident energy in the recruitment of macrophages and

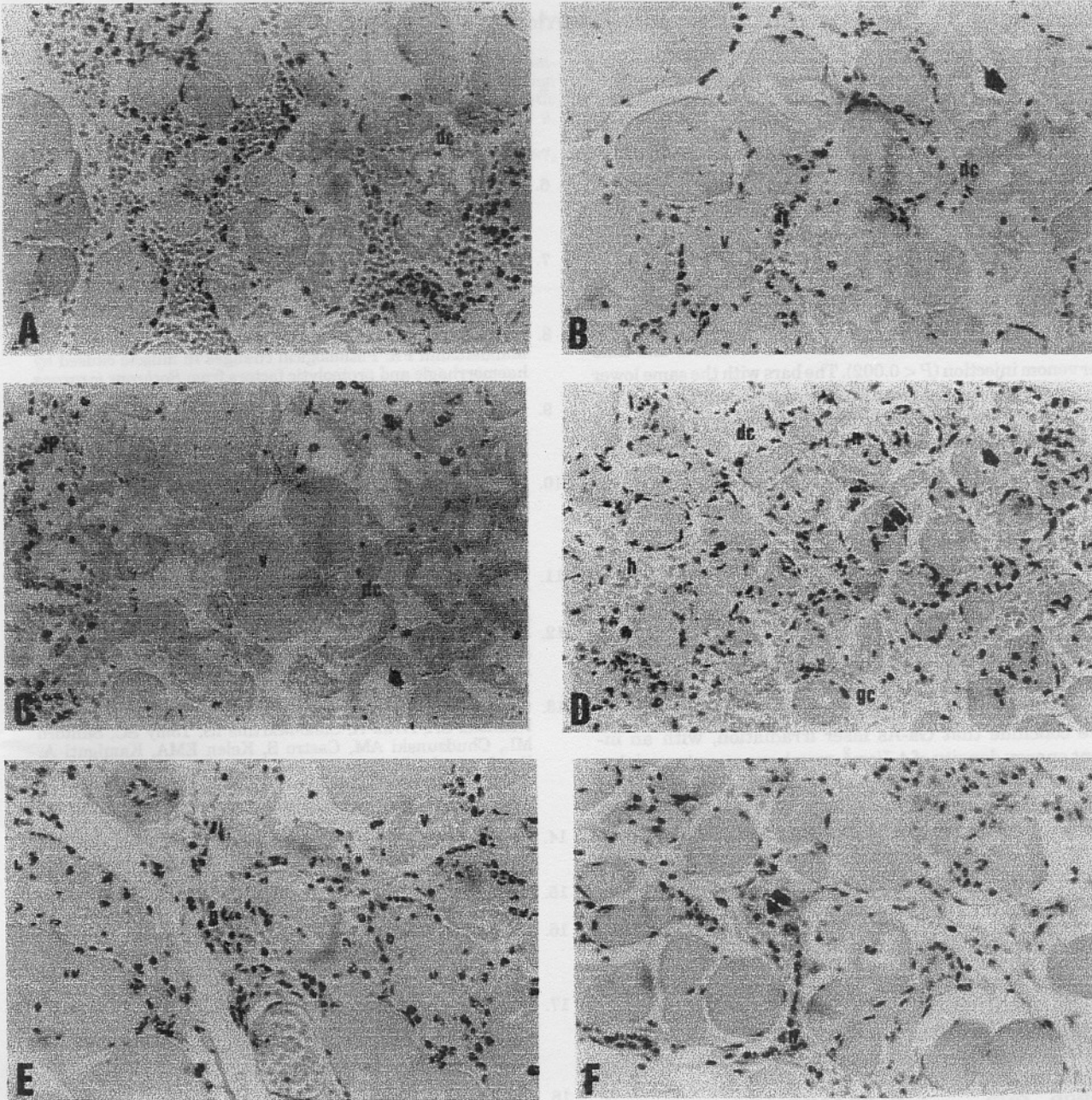


Fig. 1. Light micrographs of sections of gastrocnemius taken after injection of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (i.m.) *B. moojeni* snake venom, without (A, 3 hours; C, 12 hours; E, 24 hours) and with Ga-As laser irradiation (B, 3 hours; D, 12 hours; and F, 24 hours). Damaged cells were seen as soon as 3 hours after venom in both treatments, but massive hemorrhage (h) is prominent in unirradiated muscle. The pathogenesis of myonecrosis in both

differs with a more prominent inflammatory reaction (D = 12 hours) and a lesser number of damaged cell (F = 24 hours) in laser-irradiated mice. dc, densely clumped myofibrils; gc, host cells, arrows in (B) and (C)—clear areas in hypercontracted fibers, arrows in (D) and (F)—fibers invaded by phagocytic cells. n, neutrophils; v, vacuoles. 400 $\times$.

consequently the acceleration of phagocytosis. In our histopathological analysis, we detected a mixed population of neutrophils and macrophages, apparently higher in irradiated samples. The macrophages apparently emerged

and proliferated early at the injured site in irradiated mice, enhancing phagocytosis and removing the necrotic tissue remains faster, which could contribute to a better tissue recovery. If and how laser irradiation modulates this

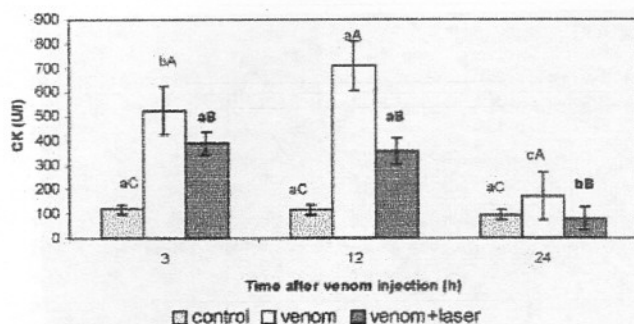


Fig. 2. CK levels in venom-injected mice with and without Ga-As laser irradiation ($P < 0.05$). The results of the two-way ANOVA were significant for treatment ($P < 0.0001$) and time after venom injection ($P < 0.002$). The bars with the same lower case letter indicate that there was no treatment difference. The bars with the same capital letter indicate that there was no time difference. In both cases the means were compared using orthogonal contrasts.

venom-evoked tissue reaction is beyond the scope of this work, and represents a relevant matter for investigation. Such a hypothesis is far from being unrealistic, since there is an expanding understanding that interactions of a selected light wavelength and biological processes could be established in order to obtain a desirable positive or negative effect.

We conclude that Ga-As laser irradiation, with an incident energy density of 4 J/cm^2 , may have an antagonizing effect on the myotoxic and/or muscle-damaging activity of *B. moojeni* venom. The low-energy laser use could be an interesting combined tool for studying and understanding the complexity of the mechanisms underlying the myonecrotic process after snake envenoming.

ACKNOWLEDGMENTS

We are deeply grateful to the Faculty of Physical Therapy (UNIDERP) for the loan of the Ga-As laser, to Paulo T. Carvalho, Manuel Vicente da Silva, and Helder A. Souza for their valuable technical assistance. We also gratefully acknowledge the Brazilian agencies FAPESP, CNPq, and FAEP-UNICAMP, for financial support.

REFERENCES

1. Brazilian Health Ministry. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília, DF, 1998.
2. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: A review. *Memórias do Instituto Butantan* 1989;51:211–223.
3. Dart R, McNally JT, Spaite DW, Gustafson R. The sequelae of pitviper poisoning in the United States. In: Campbell JA, Brodie ED, editors. *Biology of the pitvipers*. Selva: Tyler; 1992. pp 395–404.
4. Warrel DA. Clinical toxicology of snake in Asia. In: Meier J, White J, editors. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Boca Raton: CRC Press; 1995. pp 493–594.
5. Ribeiro LA, Albuquerque MJ, de Campos VA, Katz G, Takaoka NY, Lebrao ML, Jorge MT. Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: Evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. *Rev Assoc Med Bras* 1998; 44:312–318.
6. Ownby CL. Locally acting agents: Myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier WT, Mebs D, editors. *Handbook of toxinology*. New York: Marcel Dekker; 1990. pp 602–654.
7. Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, Franca FO, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* 1992;30:1603–1608.
8. Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 1985;23:341–345.
9. Gutiérrez JM, Romero M, Diaz C, Borkow G, Ovidia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1995;33:19–29.
10. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, Theakston RD. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol* 1996;26:2000–2005.
11. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000;82:841–850.
12. Jorge MT, Ribeiro LA, da Silva ML, Kusano EJ, de Mendonça JS. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: A prospective study. *Toxicon* 1994;32:743–748.
13. Cardoso JL, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, Chudzinski AM, Castro S, Kelen EMA, Kamiguti A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed viper (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Quart J Med* 1993;86: 315–325.
14. Blackman JR, Dillon S. Venomous snakebite: Past, present, and future treatment options. *J Am Board Fam Pract* 1992; 5:399–405.
15. Sokal RR and Rohlf FJ. *Biometry*, 3rd edition. New York: Freeman; 1995. 887 p.
16. Maraganore JM, Heinrikson RL. The lysine-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A2. *J Biol Chem* 1986;261:4797–4804.
17. Rufini S, Cesaroni P, Desideri A, Farias R, Gubensek F, Gutierrez JM, Luly P, Massoud R, Morero R, Pedersen JZ. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry* 1992;31:12424–12430.
18. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995;33:1405–1424.
19. Ownby CL, Selistre de Araujo HS, White SP, Fletcher JE. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon* 1999;3:411–445.
20. Iwasaki A, Shieh TC, Shimohigashi Y, Waki M, Kihara H, Ohno M. Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin I, from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu snake) which releases fibrinopeptide B. *J Biochem (Tokyo)* 1990;108:822–828.
21. Furtado MF, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 1991;29: 219–226.
22. Serrano SM, Matos MF, Mandelbaum FR, Sampaio CA. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom—I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. *Toxicon* 1993a;31:471–481.

23. Serrano SM, Sampaio CA, Mandelbaum FR. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom—II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. *Toxicon* 1993b;31:483–492.
24. Bell WR, Jr. Defibrinogenating enzymes. *Drugs* 1997; 54(Suppl 3):18–30; discussion 30–31.
25. Castro HC, Fernandes M, Zingali RB. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon* 1999;37:1403–1416.
26. Lomonte B, Gutiérrez JM, Furtado MF, Otero R, Rosso JP, Vargas O, Carmona E, Rovira ME. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* 1990;28:1137–1146.