

## Ação da radiação laser de (GaAIs, 780nm) em músculo tibial de ratos inoculados com veneno de *Bothrops leucurus*.

Thiago da Silva Chaves<sup>1</sup>; Wellington Ribeiro<sup>2</sup>; José Carlos Cogo<sup>2</sup>; Antonio Carlos G. Prianti-Júnior<sup>2</sup>; Egberto Munin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade Ciências da Saúde (FCS) – Engenharia Biomédica,

<sup>2</sup> Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica; <sup>3</sup> Laboratório de Biofotônica e Óptica não Linear, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D),  
Universidade do Vale do Paraíba (Univap), Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova,  
São José dos Campos – SP – Brasil, 12.244-000, Fone: (12) 3947-1087.

e-mail: thiagochaves@terra.com.br, prianti@univap.br; munin@univap.br

**Resumo-** Desde os tempos antigos a luz é utilizada para fins terapêuticos, mas a grande ascendência da utilização da luz na área médica surgiu com o aparecimento do laser na década 60. Existem varias formas de lesões e uma lesão por ordem química é decorrente de acidente ofídico. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da irradiação direta do laser de GaAIs, no comprimento de onda de 780nm, sobre as alterações na contração muscular produzidas pela injeção do veneno de *Bothrops leucurus* no músculo tibial de ratos *in vivo*. Os experimentos foram realizados utilizando o laser de 780nm com densidade de energia variando de 4J e 12J com 1 ou 3 doses de aplicação. Os valores obtidos nos experimentos demonstram que com uma aplicação de 12J e 3 aplicações de 4J foi possível reverter o efeito do veneno na contração quando empregada em poucas doses.

**Palavras-chave:** Músculo Tibial, Laser, Contração Muscular, *Bothrops leucurus* (jararaca-do-rabo-branco).  
**Área do Conhecimento:** III - Engenharias

### Introdução

Desde os tempos antigos a radiação luminosa (então luz solar) foi utilizada com fins terapêuticos. Os indianos (1400 AC) criaram uma substância fotossensibilizadora obtida de plantas, que era aplicada sobre a pele dos pacientes, assim promovendo a absorção da luz solar para curar a discromia causada pelo vitiligo (Brugnera e Pinheiro, 1998).

A partir desta descoberta os gregos, árabes e romanos difundiram diversas terapias para o tratamento de doenças da pele (Brugnera e Pinheiro, 1998).

No ano de 1916, Albert Einstein lançou os fundamentos da invenção do laser, o maser, a partir da lei de Max Planck. A teoria ficou esquecida até o final da Segunda Guerra Mundial (wikipedia).

No ano de 1953, Charles Hard Townes, James P. Gordon e Herbert J. Zeiger produziam o primeiro Maser, um dispositivo similar ao laser, mas que produz microondas em vez de luz visível com um meio ativo a base de amônia. O primeiro oscilador quântico a operar no espectro visível foi o laser de rubi, apresentado em 1960 por T. H. Maiman.

Nos anos seguintes, muitas novidades surgiram, pois Javan, Bennett e Herriot apresentaram o laser de He-Ne que foi o primeiro laser a operar no modo contínuo. Johnson desenvolveu o laser de Nd:YAG, em 1964, enquanto Patel e colaboradores apresentaram o laser de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>). Os lasers de Gálio e Alumínio (semicondutores) foram apresentados em 1962. (wikipedia).

A designação Laser, na realidade, originou-se da abreviação de Light Amplification by Stimulated emission of Radiation.

As lesões musculares podem ser de ordem física, como feridas cirúrgicas ou traumas mecânicos; congelamento ou calor excessivo; como também podem ser por alteração química (anóxia, anestésicos locais, dentre outros). (Botelho, *et al.* 2005).

A contração muscular é considerada um mecanismo natural de lesão, pois ocorre em condições mais fisiológicas quando comparada a outras formas de indução. Além disso, a lesão causada pela contração é muito comum, sendo responsável por mais de 30% do acometimento do músculo durante a prática desportiva. (Botelho *et al.* 2007)

Nas lesões de ordem química, podemos citar também as lesões que acontecem em

decorrência de acidentes ofídicos. Principalmente nos países tropicais. Nos acidentes botrópicos o total de letalidade é menor que no crotálico, porém é bastante importante pelo alto índice de incidência (90,5%). (Barravieira, 1994)

Das espécies botrópicas, *Bothrops leucurus* (Bleu), popularmente conhecida como jararaca-do-rabo-branco, é o agente causador mais freqüente acidentes na região da cidade de Salvador no estado da Bahia. (Barravieira, 1994)

O veneno de serpente é uma mistura de substâncias simples e complexas, sendo que, 90 à 95% do seu peso seco é constituído de proteína e componentes não-protéico, como amina bioativas, aminoácidos, peptídeos, enzimas (fosfolipases, peptidases, fosfodiesterases). (Brazil, 1982)

A peçonha botrópica é caracterizada por apresentar ações coagulante, hemorrágica, citotóxica e antiinflamatória, sendo o choque a principal causa de morte. (Brazil, 1982) Também, é visível no local da picada, edema e necrose. (Brazil, 1982)

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da irradiação direta com laser de GaAlAs, no comprimento de onda de 780nm com energia variando de 4J e 12J, sobre as alterações na contração muscular produzidas pela injeção do veneno de *Bothrops leucurus* no músculo tibial de ratos *in vivo*.

## Metodologia

Protocolo de ética: este experimento foi submetido e aprovado integralmente pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Univap, processo A016/2006/CEP.

Condição Experimental: a parte experimental foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica do IPD, Univap.

Animais: foram utilizados ratos machos *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar com peso variando de 180 a 230 g. Os 47 animais foram mantidos acondicionados em gaiolas em ambiente higienizado, com controle de temperatura e luminosidade, ciclo de claro e escuro de 12 horas e com acesso a água e ração *ad libitum*.

Protocolo de anestesia: os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina, 100 mg/kg por via intramuscular (i.m.) e analgesiado com Turbogesic®, dose de 0,1 mg/kg via (i.m.). Para eutanásia, foi adotada a administração intracardíaca de KCl (10%).

Veneno: o veneno bruto e liofilizado de *Bothrops leucurus* (Bleu) utilizado nos experimentos foi gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan, São Paulo.

Técnica de Estimulação do Músculo Tibial Anterior de rato: após anestesia, o animal foi fixado numa mesa cirúrgica em decúbito dorsal com os membros em abdução e com respirador de

oxigênio fixado ao focinho para a manutenção da homeostasia. Foi realizada uma incisão na região antero-distal da perna esquerda na qual a pele e tecidos adjacentes foram divididos e o músculo e tendão correspondente foram expostos e isolados. Na inserção muscular próxima a região plantar do metatarso, o músculo através do tendão foi posicionado horizontalmente e conectado através de uma linha de algodão a um transdutor isométrico (BG-25 GM Kulite, semiconductor products Inc) e este ao fisiógrafo (GEMINI7070, Ugo Basile) para registro. O músculo, durante todo o protocolo experimental, foi mantido umidecido com solução de Tyrode (37°C). O nervo ciático foi liberado dos tecidos adjacentes com bisturi de vidro e fixado a um eletrodo conectado a um estimulador (Grass-S4) que produziu estímulos indiretos, supramaximais, com duração de 2 ms e freqüência de 1 Hz. O músculo então foi submetido a uma tensão constante de 10g, estando pronto para o protocolo experimental.

A luz Laser incidiu perpendicularmente ao músculo, na porção umterço distal.

Parâmetro do Laser: o Laser utilizado Twin Laser (MM Optics, São Carlos) gerou um feixe de 780nm de comprimento, energia de 4J e 12J, densidade de energia 20,4 J/cm<sup>2</sup> e 61,2 J/cm<sup>2</sup>, potência de 40 mW, densidade de potência de 0,20 W/cm<sup>2</sup>, área do feixe de 0,196 cm<sup>2</sup>, com tempo de duração de 100 e 300 segundos.

Protocolo Experimental: os animais foram agrupados de forma aleatória, em 11 grupos experimentais: grupo (1) controle: animais sob estimulação por 120 minutos (n=5); grupo (2) salina: foram injetados no músculo tibial esquerdo, 50 µl de salina e estimulação por 120 minutos (n=5); grupo (3) Laser (780nm/4J/1 dose): músculo irradiado 30 minutos após início da estimulação, estimulação total de 120 minutos (n=5); grupo (4) Laser (780nm/4J/3 doses): músculo irradiado 30, 60 e 90 minutos após início da estimulação, estimulação total de 120 minutos (n=5); grupo (5) Laser (780nm/12J/1 dose): músculo irradiado 30 minutos após início da estimulação, estimulação total de 120 minutos (n=5); grupo (6) Laser (780nm/12J/3 doses): músculo irradiado 30, 60 e 90 minutos após início da estimulação, estimulação total de 120 minutos (n=5); grupo (7) Veneno *Bothrops leucurus*: administração (i.m.) de 100 µg/animal de veneno e estimulação por 120 minutos (n=3); grupo (8) Veneno + Laser (780nm/4J/1 dose): administração (i.m.) de 100 µg/animal de veneno e irradiação com Laser após 30 minutos do início da estimulação (n=5); grupo (9) Veneno + Laser (780nm/4J/3 doses): administração (i.m.) de 100 µg/animal de veneno e irradiação com Laser após 30, 60 e 120 minutos do início da estimulação (n=3); grupo (10) Veneno + Laser (780nm/12J/1 dose): administração (i.m.) de 100 µg/animal de veneno e irradiação com

Laser após 30 minutos do início da estimulação (n=5); grupo (11) Veneno + Laser (780nm/12J/3 doses): administração (i.m.) de 100 µg/animal de veneno e irradiação com Laser após 30, 60 e 120 minutos do início da estimulação (n=3).

Análise Estatística: para todos os dados obtidos, foram calculados a média e o erro padrão da média. A diferença entre os grupos controle e tratados e entre os tratados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para comparação múltipla. Foram considerados

significativos valores de  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ .

## Resultados

A figura 1 representa a comparação entre o grupo controle e o grupo irradiado com Laser, com apenas 1 dose de irradiação. Observou-se que a radiação promoveu facilitação na contração muscular, sendo que de forma significativa no grupo irradiado com 4J de energia.

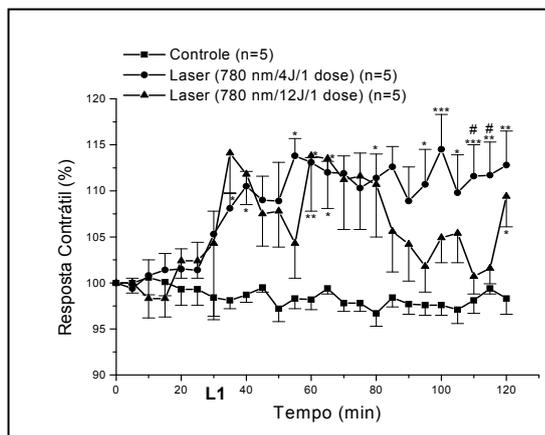


Figura 1: Gráfico comparativo do efeito sobre a contração muscular das duas doses aplicadas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (comparação Laser com controle); # $p < 0,05$  (comparação Laser 12J com 4J).

Para a energia aplicada sobre o músculo em 3 doses distintas, a facilitação foi significativa para a menor energia utilizada.(Figura 2)

Os animais administrados com salina não apresentaram diferença comparativamente com aqueles que só foram estimulados (controle).

Os músculos tratados com a peçonha obtiveram um bloqueio de contração de 55% após 120 minutos de observação. (Figura 3)

Para os grupos administrados com veneno e tratados com Laser com uma única aplicação, a energia empregada de 12J apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo administrado somente com o veneno da serpente. (Figura 4)

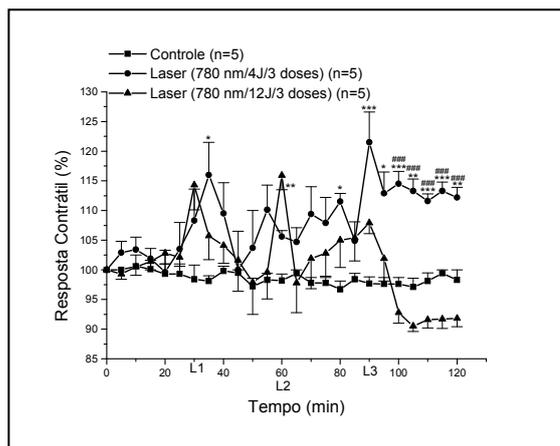


Figura 2: Gráfico comparativo do efeito sobre a contração muscular das duas doses aplicadas.\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (comparação Laser com controle); ### $p < 0,001$  (comparação Laser 12J com 4J)

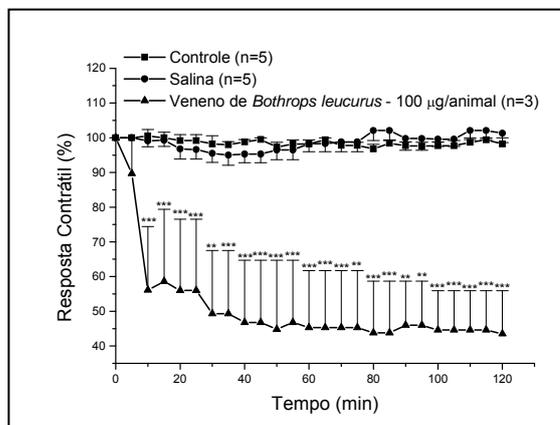


Figura 3: Curva do efeito da peçonha de *Bothrops leucurus* sobre a contração do músculo tibial anterior de rato.\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (comparação veneno com controle)

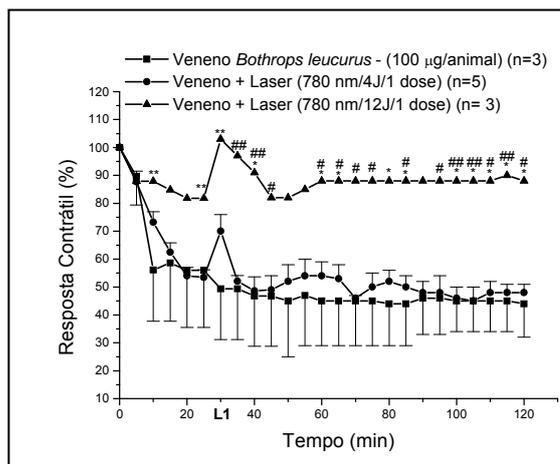


Figura 4: Gráfico comparativo do efeito sobre a contração muscular das duas doses aplicadas com ação do veneno de *Bothrops leucurus*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (comparação grupo Laser + veneno com grupo veneno); # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,01$ ; #### $p < 0,001$  (comparação grupo veneno + Laser 4J com grupo veneno + Laser 12J)

A Figura 5 representa a comparação entre os grupos administrados com veneno e tratados com Laser (4J e 12J) em 3 aplicações com intervalo de 30 minutos entre elas. Neste caso, observou-se facilitação na contração muscular de forma significativa para o grupo de 4J, principalmente após a segunda aplicação de Laser (60 minutos após a administração do veneno).

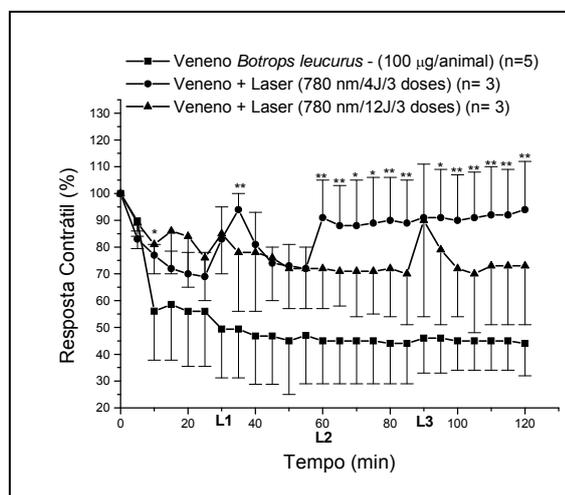


Figura 5: Gráfico comparativo do efeito sobre a contração muscular das duas doses aplicadas com ação do veneno de *Bothrops leucurus*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (comparação grupo Laser + veneno com grupo veneno); # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  (comparação grupo veneno + Laser 4J com grupo veneno + Laser 12J)

## Discussão

O resultado obtido da contração muscular sob ação do veneno de *Bothrops leucurus*, em experimento *in vivo*, mostra que a redução é parcial conforme Prianti-Júnior (2001), constatou em preparação neuromuscular em músculos de aves. Resultado semelhante obteve Almeida Silva. (2003), em preparação neuromuscular *in vivo* utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*.

Conforme a literatura especializada, Laser de Baixa Potência é capaz de proteger ou até mesmo acelerar processos regenerativos, desde que seja aplicado corretamente e com dosimetria adequada sobre o tecido biológico (Enwemeka *et al.*, 1990; Bibikova & Oron, 1993 e 1994; Nissan *et al.*, 1996; Luger *et al.*, 1998; Tatarunas *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2001; Garavello *et al in press* IN Almeida Silva, R, 2003).

Os dados obtidos mostraram que energia de 4J gerada por um Laser de Baixa Potência foi mais eficiente em reverter a ação do veneno de *B. leucurus*. Corroborando com estes dados, Almeida Silva (2003), o efeito da radiação Laser de He-Ne na dose de baixa densidade de energia (3.5 J/cm<sup>2</sup>) promove ação protetora no músculo lesado por veneno de serpente.

## Conclusão

Com os dados obtidos pôde-se concluir que:

- O veneno de *Bothrops leucurus* induz o bloqueio irreversível da contração muscular em músculo tibial de rato *in vivo* de forma tempo dependente;
- A energia de 4J tem a capacidade de reverter o efeito da peçonha na contração muscular de forma mais eficiente, tanto em dose única quanto em doses múltiplas;
- Energia maior se torna mais eficiente em reverter o efeito do veneno na contração quando empregada em poucas doses.

## Agradecimentos

Agradecimento especial a FAPESP

## Referências

- BARRAVIEIRA, B. Venenos animais: uma visão integrada. 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. Publicações Científicas, 1994. P 109-134.
- BRAZIL, O.V. peçonhas in cobert – Farmacodinâmica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. P57-79.
- COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A. CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI, L – Effect of bothrops insularis venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, 31: 1237-1247, 1993.
- ROSANY DOIN ALMEIDA SILVA – Ação da Irradiação por Laser de Baixa Energia HeNe nas alterações musculares causadas pela inoculação de veneno bruto de *bothrops jararacussu*. *Estudo in vivo em ratos*. Tese de Doutorado publicado na Unicamp, 2003
- ANTONIO C. G. PRIANTI JR *et al.*- Effect of *Bothrops leucurus* Venon in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, 595-603, 2003.
- BRUGNERA JÚNIOR, A; PINHEIRO, A. L. B. – Laser na odontologia Moderna. 1. Ed., São Paulo, Pancast, 1998, 306p.
- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Laser> - acesso dias 20/07/2007
- BOTELHO AP; FACIO FA; MINAMOTO VB - Regeneração do músculo tibial anterior em diferentes períodos após lesão por estimulação elétrica neuromuscular **Rev. Bras. de Fisioter.** Vol. 11 no.2 2007.