

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTESIDADE E LED NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE *BOTHROPS JARARACA*.

Santos, C.M. ¹, Pereira, E.S. ², Rabelo, N.S. ³, Zamuner, S.R. ⁴, Barbosa, A. M. ⁵, Cogo, J. C. ⁶

¹ Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) / Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica ^{1,2,3,4,5,6} Brasil, Fone:+55 12 3947 1106; caroll.mds@hotmail.com, laine_souper@hotmail.com, natan_rabelo@hotmail.com, szamuner@unicamp.br, abarbosa01@yahoo.com.br, jccogo@univap.br

Resumo- A hemorragia local é um sério problema ocasionado pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. O tratamento preconizado para o acidente ofídico é a soroterapia poliespecífica. Entretanto, a soroterapia tem se mostrado ineficaz na neutralização dos efeitos locais. Esta pesquisa estudou *in vivo* os efeitos da terapia Laser de Baixa Potência (LBP) e do LED (Light Emission Diode) terapia na atividade hemorrágica induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* em camundongos. Os animais foram divididos em grupos (n=4). O 1º grupo recebeu apenas o veneno; o 2º recebeu veneno e a terapia com LBP, o 3º recebeu veneno e a terapia LED e o 4º solução salina-controle. Ambas as terapias foram aplicadas perpendicularmente a uma distância de 1 cm do local da injeção do veneno (60s). Após 2 horas, os camundongos foram sacrificados, a pele removida, o halo hemorrágico mensurado em mm e a área hemorrágica demarcada. Os dados do presente estudo demonstraram que os tratamentos com as terapias foram capazes de reduzir o efeito hemorrágico causado pelo veneno.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, Hemorragia, Laser terapia e LED terapia.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

Os acidentes causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* não apresentam alta letalidade (0,31 %), porém devido à alta incidência e as sequelas deixadas nos acidentados, são consideradas de grande importância epidemiológica no país (BRASIL, 2001).

Os venenos botrópicos induzem reações locais imediatas como a hemorragia (RODRIGUES et al., 2001).

O tratamento utilizado em casos de acidentes ofídicos é a soroterapia específica. Porém, apesar da eficácia do soro antiofídico em diminuir a letalidade e reverter os efeitos sistêmicos, as lesões locais não são neutralizadas de modo eficiente (PICOLO et al., 2002). Dependendo do grau de envenenamento, essa dificuldade de neutralização pode resultar na perda total do tecido afetado (ZAMUNER et al., 2004, BARBOSA et al., 2009). Algumas alternativas têm sido propostas para substituir ou combinar com o uso de soroterapia, entre elas algumas baseadas na utilização de plantas medicinais (CAVALCANTE et al., 2007). Outra possibilidade que começa a ser implementada com muito sucesso por alguns autores é a utilização de laserterapia (BARBOSA et al., 2008; DOIN-SILVA et al., 2008).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar *in vivo* os efeitos da terapia laser de baixa potência (LBP) e do LED terapia na atividade hemorrágica induzida pelo veneno total da serpente *Bothrops jararaca* na região dorsal de camundongos.

Materiais e Métodos

Veneno: O veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi fornecido pelo Serpentário do CEN (Centro dos Estudos da Natureza) da UNIVAP. O veneno liofilizado foi mantido sob refrigeração a 4°C, sendo diluído em solução salina (0,9%) somente no momento do uso.

Animais: Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (30 g), provenientes do biotério da Anilab, Paulínia, SP. Os animais foram pré-tratados com antiparasitários e mantidos com água e alimentação *ad libitum*, em sala com temperatura e umidade constante (24°C – 60%), com ciclo claro – escuro (12/12 horas).

Protocolo de Ética: A condução científica desta pesquisa seguiu as normas e registros da resolução CNS 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e foi realizada somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP sob o nº A037/CEP/2009.

Protocolo de Eutanásia: Os animais foram anestesiados com 10 mg/Kg de Xilazina (Virbaxyl 2% injetável; 0,1 mg/Kg i.p.) + 100 mg/Kg de Ketamina (Dopolen injetável; 1 mL/Kg i.p.). Em seguida, sob o efeito do anestésico, foi administrada overdose de Cloreto de Potássio a 10% (intracardiaco) (FLECKNELL, 2000).

Curva dose-resposta: Para determinar a melhor dose do veneno para induzir um halo hemorrágico de 1 cm, os animais foram injetados (s.c.) com 3 doses diferentes, 10, 20 e 40 µg/50 µL do veneno. Os animais foram sacrificados 2 horas após de acordo com o protocolo de eutanásia acima citado e o halo hemorrágico foi mensurado.

Avaliação da atividade hemorrágica: Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=4). Para este protocolo o primeiro grupo recebeu somente veneno; o segundo grupo recebeu veneno mais a terapia com o Laser, o terceiro grupo recebeu veneno mais a terapia LED e o quarto grupo solução salina-controle. A terapia LED foi aplicada perpendicularmente a uma distância de 1 cm do local da injeção de veneno. O controle foi feito injetando o mesmo volume de salina aprotínica. O efeito hemorrágico foi induzido através de injeção por via subcutânea (s.c.), na região dorsal de cada animal. Após 2 horas, os camundongos foram sacrificados com overdose de anestésico de acordo com o protocolo de eutanásia acima citado, a pele foi removida, o halo hemorrágico foi mensurado em mm e a área hemorrágica demarcada, para a contagem do diâmetro da área hemorrágica, através da expressão:

$$r = 2 \cdot \sqrt{\frac{a}{\pi}}$$

Onde:

a = área

r = raio

Laser terapia: Foi utilizado o aparelho de laser (Thera Laser D.M.C.) semiconductor de modo contínuo, operando em 685 nm, com potência de 10 mW, na dose 2,2 J/cm², tempo de irradiação de 60 segundos e área de 0,8 cm². Esta dose foi escolhida com base em estudos prévios mostrando o efeito benéfico da terapia laser de baixa potência no processo de regeneração tecidual (KITCHEN, 1998).

LED terapia: Foi utilizado o aparelho de LED infravermelho, nos seguintes parâmetros: irradiância de 20 mW, fluência de 2,5 J/cm² durante 60s.

Os animais foram inoculados pôr via subcutânea (s.c.) com veneno total de *Bothrops jararaca*

na região dorsal. O grupo controle recebeu solução salina estéril em volume constante de 50 µL. A concentração de 10 µg/animal de veneno foi utilizada, por causar halo hemorrágico mensurável e sem atingir tecidos adjacentes. Todos os grupos receberam terapia laser de baixa potência e terapia LED 1 hora após a injeção do veneno. Ambas as terapias foram aplicadas diretamente no local da injeção de veneno e/ou solução salina estéril, de forma perpendicular a uma distância de 1 cm do local da injeção do veneno. Tanto terapia laser quanto a terapia LED foram aplicadas 1 hora após indução de hemorragia.

Método Estatístico: Para todos os dados obtidos foram realizados cálculos de média e erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste de variância ANOVA com pós-teste de Turkey-Kramer para comparação múltipla onde foram considerados significativos quando p < 0,05.

Resultados

Para determinar a melhor dose do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, que induzisse um halo hemorrágico com 1 cm de diâmetro, os animais receberam 3 doses diferentes do veneno, sendo 10, 20 e 40 µg (Fig. 1). A dose selecionada foi de 10 µg, por apresentar um halo hemorrágico ideal sem atingir tecidos adjacentes. As terapias LBP e LED mostraram uma redução significativa no efeito hemorrágico (p < 0,5) em comparação com os grupo que recebeu somente o veneno. Ambas as terapias inibiram a formação hemorrágica, sendo LBP 36 % e a LED 28 %, no tempo de 2 hs, respectivamente (Fig. 2). O grupo que recebeu somente salina estéril não apresentou efeito hemorrágico (dados não mostrados).

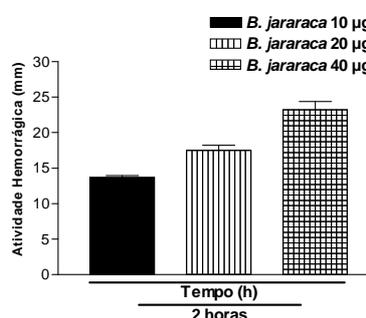


Figura 1: Efeito hemorrágico causado pelo veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* na região dorsal de camundongos nas doses de 10, 20 e 40 µg/ animal. Os dados representam a média ± E.P.M. n = 4 animais (p < 0,05).

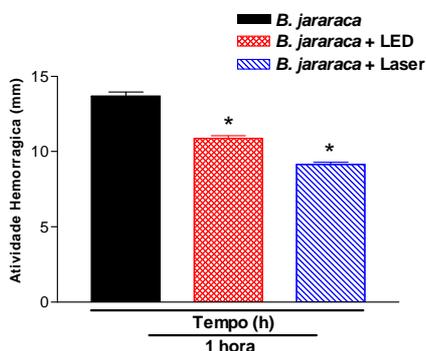


Figura 2: Neutralização da atividade hemorrágica induzida pelo veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca*, pelas terapias LED e Laser. Os animais foram injetados com a dose de 10 µg de veneno diluído em solução salina estéril. Os dados representam a média ± E.P.M. n = 4 animais (p<0,05).

Discussão

A hemorragia local causada pelo envenenamento botrópico é de responsabilidade das metaloproteinasases presentes nos venenos das serpentes (BJARNASON and FOX, 1994; SANT'ANA et al., 2007). Estes efeitos têm sido associados com a atividade das toxinas em proteínas da matriz extracelular (BJARNASON and FOX, 1994; RODRIGUES et al., 2001).

O resultado do presente estudo mostra que a injeção do veneno da serpente *Bothrops jararaca* causou hemorragia. Este resultado também foi observado por Gonçalves e Mariano (2000) estudando o mesmo veneno. Os animais que receberam somente solução salina não apresentaram presença hemorrágica. O tratamento da terapia laser e terapia LED foram capazes de reduzir a hemorragia causada pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. O uso de terapia laser e da terapia LED mostra que os animais que receberam ambos os tratamentos apresentaram redução do Halo hemorrágico comparando com o grupo que recebeu somente veneno no mesmo período de tempo. A literatura ainda apresenta poucos trabalhos mostrando a eficácia da terapia laser no envenenamento botrópico, tais como inflamação e mionecrose (DOIN-SILVA et al., 2008; BARBOSA et al., 2008/2009) e nenhum trabalho com terapia LED. Por outro lado, vários trabalhos têm mostrado a eficácia do tratamento com terapia laser na inflamação (VLADMIROV et al., 2004; ALBERTINI et al., 2007), regeneração tecidual (SCHINDL et al., 2003) e LED no tratamento para alívio da dor

(VINCK et al., 2005). Ambas as terapias causaram uma redução significativa da hemorragia induzida pelo veneno. Este efeito mostra que na ausência de tratamento com soroterapia é possível fazer uso de terapia laser e terapia LED ou ainda ser utilizado como coadjuvante no tratamento. Futuros estudos devem ser feitos para identificar possíveis mediadores envolvidos neste processo.

Conclusão

Os tratamentos com terapia LTB e LED terapia foram capazes de reduzir o efeito hemorrágico induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Referências

ALBERTINI, R., VILLAVERDE, A.B., AIMBIRE, F., SALGADO, M.A., BJORDAL, J.M., ALVES, L.P., MUNIN, E., COSTA, M.S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660nm and 684nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J. Photochem Photobiol. B: Biol.* 89, 50-55, 2007.

BARBOSA, A.M., VILLAVERDE, A.B., SOUSA, L.G., RIBEIRO, W., COGO, J.C., and ZAMUNER, S.R. Effect of low power laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 51,1236–1244, 2008.

BARBOSA, A.M., VILLAVERDE, A.B., SOUSA, L.G., MUNIN, E., FERNANDEZ, C.M.C.M., COGO, J.C., and ZAMUNER, S.R. Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by *Bothrops jararacussu* Snake Venom. *Photomedicine and Laser Surgery.* 27, (4), 2009.

BJARNASON J.B., FOX J.W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharmacol. Ther.* 62 325–372, 1994.

BRASIL, Ministério da Saúde. Funasa, Manual de Diagnósticos e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2ed. Brasília (DF). 2001.

CAVALCANTE, W.L., CAMPOS, T.O., DAL PAI-SILVA, M., PEREIRA, P.S., OLIVEIRA, C.Z., SOARES, A.M., GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 25.112, 490-497, 2007.

DOIN-SILVA, R., BARANAUSKAS, V., RODRIGUES-SIMIONI, L., and CRUZ-HOFLING, M.A. The Ability of Low Level Laser Therapy to

Prevent Muscle Tissue Damage Induced by Snake Venom. DOI: 10.1111 / j.1751-1097.2008.00397.x, 2008.

FLECKNELL, P. Animal Anaesthesia, 2^a ed. Ed. Academic Press. 2000.

GONÇALVES, L.R.C., MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic. Inflammation. Mediators of inflammation. 9, 101–107, 2000.

PICOLO, G., CHACUR, M., GUTIÉRREZ, J.M., TEIXEIRA, C.F.P., AND CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* snake venoms. Bra. Jou. of Med. and Biol. Res., 35: 1221-1228, 2002.

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(6): 471-479, 2001.

SANT'ANA, C.D., TICLI, F.K., OLIVEIRA, L.L., GIGLIO, J.R., RECHIA, C.G.V., FULY, A.L., et al. (2007). BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. doi:10.1016/j.cbpa.02.036, 2007.

SCHINDL, A., MERWALD, H., SCHINDL, KAUN, C. AND WOJTA, J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. British Journal of Dermatology. 148: 334–336, 2003.

VINCK, E.; COOREVITS, P.; CAGNIE, B.; DE MUYNCK, M.; VANDERSTRAETEN, G.; CAMBIER, D. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by Light Emitting Diode irradiation. Lasers Med Sci. 20, 35-40, 2005.

VADMIROV, Y.A., OSIP, A.N., KLEBANOV, G.L., 2004. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. Biochemistry (Mosc). 69(1), 81-90.

ZAMUNER, S.R., CRUZ-HOFLING, 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. 1; 44(3), 259-271, 2004.