



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ELZILIAM ARANHA DE SOUSA

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO DE GÁLIO (AsGa)
SOBRE AS MANIFESTAÇÕES LOCAIS AGUDAS INDUZIDAS PELO VENENO DE
*Bothrops moojeni***

MACAPÁ

2012

ELZILIAM ARANHA DE SOUSA

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO DE GÁLIO (AsGa)
SOBRE AS MANIFESTAÇÕES LOCAIS AGUDAS INDUZIDAS PELO VENENO DE
*Bothrops moojeni***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como pré-requisito final para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Ensaios Biológicos

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva.

MACAPÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Sousa, Elziliam Aranha de.

Efeitos do laser de baixa potência arseneto de gálio (AsGa) sobre as manifestações locais agudas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni* / Elziliam Aranha de Sousa; orientadora Jocivânia Oliveira da Silva. Macapá, 2012.

73 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Cobra – Envenenamento – Tratamento. 2. *Bothrops moojeni* – Envenenamento – Inflamação. 3. Laser – Uso terapêutico. 4. Laser terapia. 5. Saúde pública. I. Silva, Josivânia Oliveira, orient. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

CDD. (22.ed). 615.942

ELZILIAM ARANHA DE SOUSA

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA ARSENETO DE GÁLIO (AsGa)
SOBRE AS MANIFESTAÇÕES LOCAIS AGUDAS INDUZIDAS PELO VENENO DE
*Bothrops moojeni***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), como pré-requisito final para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Ensaios Biológicos

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva.

Aprovado em 22 de Junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva - UNIFAP
Presidente da Banca

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho - UNIFAP
Examinador - Arguidor

Prof. Dr. Flávio Henrique Ferreira Barbosa – UNIFAP
Examinador - Arguidor

Prof^a. Dr^a Lorane Izabel da Silva Hage Melim – Faculdade Estácio Seama
Examinadora – Arguidora

Prof. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz – UNIFAP
Examinador - Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais Elzileide e William pelo apoio em todas as minhas conquistas. Aos meus irmãos Erica, Sandoval e Saulo, pela ajuda nos momentos de dificuldades. Ao meu noivo Alexandre, pela ajuda e paciência. Ao meu cunhado Alonso pelo incentivo. Aos meus parentes e amigos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desta vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte de força e perseverança, que sempre me acompanha em todos os momentos.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva, pelos ensinamentos, paciência, amizade e profissionalismo durante toda a jornada. Muito obrigada!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do Prof. Dr. Flávio Henrique Ferreira Barbosa, seu coordenador, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho por permitir a realização de parte desta pesquisa no Laboratório de Fármacos/UNIFAP e pelo exemplo de profissionalismo.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia/UNIFAP: Shayanne, Leide, Adolfo, Camila, Nayana, Rafael e Maxwell, pela ajuda durante todos os experimentos. Com vocês aprendi o verdadeiro significado da palavra equipe. Jamais esquecerei de vocês!

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos/UNIFAP: Prof^a Clarissa, Prof^o Hugo, Prof^a Mayara, Charles, Benedito, Uriel, Helison, Anderson, Monique, Jean, Mayara e Beatriz pelo carinho e ajuda na realização desse sonho.

Aos profissionais José Renato Ribeiro, Breno Nery e Washington Pereira pelo auxílio na realização desta pesquisa.

À minha irmã Erica pela ajuda em todos os momentos.

Ao meu noivo Alexandre, pela compreensão e paciência durante a concretização desse objetivo.

Ao meu grande amigo Elinaldo, pelo apoio e amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

Os acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* provocam manifestações locais e sistêmicas, cujo tratamento é realizado através da administração do soro antiofídico. Porém, a eficácia da soroterapia é limitada, neutralizando apenas parcialmente as alterações patológicas locais, sendo necessário o estudo de possíveis alternativas terapêuticas que complementam a ação desta. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio (904 nm), dose de 4 J/cm², sobre as manifestações locais agudas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Trata-se de um estudo experimental, com o uso de camundongos da linhagem *Swiss webster*, onde foram avaliadas as variáveis dependentes: edema, nocicepção, infiltrado inflamatório e mionecrose. Para tanto, os animais foram divididos em cinco grupos: grupo controle solução salina estéril; grupo controle veneno; grupo veneno+soro; grupo veneno+laser e grupo veneno+soro+laser. Na organização e análise dos dados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$). Os resultados indicaram que em relação à atividade edematogênica, na 1^a hora após a administração do veneno, somente os animais do grupo veneno+laser mostrou redução significativa do edema de pata em 22,76%. A partir da 6^a hora os animais do grupo veneno+laser+soro tiveram redução significativa do edema em 10,5%. Quanto à atividade nociceptiva, somente os animais do grupo veneno+laser+soro mostraram redução significativa em 36,29% (1^a fase) e em 43,52% (2^a fase). Em relação ao infiltrado inflamatório muscular, apenas os animais dos grupos veneno+soro e veneno+laser+soro tiveram redução significativa em 20,69% e 22,42%, respectivamente. Em relação à mionecrose, as lâminas dos animais do grupo veneno+soro mostraram menor porcentagem de mionecrose (60%) e maior de regeneração muscular (100%). Conclui-se que em relação ao edema e nocicepção em camundongos, o laser de baixa potência Arseneto de Gálio (904 nm) mostrou-se eficaz somente quando associado com o soro. Em relação ao infiltrado inflamatório muscular, o laser apresentou eficácia quando administrado isoladamente e quando associado ao soro. Em relação à mionecrose, os animais do grupo veneno+laser apresentaram regeneração muscular e menor porcentagem de mionecrose. Portanto, esses resultados sugerem que o laser Arseneto de Gálio (AsGa) pode ser considerado uma alternativa terapêutica para o tratamento dos efeitos locais provocados por picadas de serpentes do gênero *Bothrops*.

Palavras-chaves: *Bothrops moojeni*. Inflamação. Laserterapia.

ABSTRACT

The accidents caused by snakes of the *Bothrops* genus cause local and systemic manifestations, whose treatment is accomplished by administration of snakebite serum. However, the efficacy of serotherapy is limited only partially counteracting the pathologic changes locations, it is necessary to study possible therapeutic means complementary to this action. The present study aimed to evaluate the effects of low power laser Gallium Arsenate (904 nm), dose of 4 J/cm², on local acute manifestations induced by the venom of *Bothrops moojeni*. This is an experimental study using *Swiss webster* mice of strain, where the dependent variables were evaluated: edema, nociception, inflammatory infiltrate and myonecrosis. To this end, the animals were divided into five groups: sterile saline solution control group; venom control group; venom+serum group; venom+laser group and venom+laser+serum group. In organizing and analyzing data, we used analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer test, with statistical significance level of 5% ($p < 0.05$). The results indicated that activity in relation to edema in the first hours after the administration of venom, only the animals venom+laser group showed a significant reduction of paw edema by 22,76%. From the sixth hour the animals of the group venom+laser+serum had a significant reduction of edema in 10,5%. As for the nociceptive activity, only the animals in group venom+laser+serum showed a significant reduction in 36.29% (first phase) and 43.52% (second phase). Regarding the inflammatory infiltrate muscle, only animals of serum+venom groups and venom+laser+serum had significant reduction in 20.69% and 22.42% respectively. Regarding myonecrosis, the blades of the animals of the venom+laser+serum showed lower percentage of myonecrosis (60%) and major muscle regeneration (100%). It is concluded that in relation to edema and nociception in mice, the low power laser Gallium Arsenate (904 nm) was effective only when associated with the serum. In relation to the inflammatory infiltrate muscle, the laser exhibit efficacy when administered alone and when combined with serum. Regarding myonecrosis, animals venom+laser group showed muscle regeneration and a lower percentage of myonecrosis. Therefore, these results suggest that laser Gallium Arsenate (GaAs) can be considered an alternative therapy for the treatment of local effects caused by snakebite from *Bothrops* genus.

Keywords: *Bothrops moojeni*. Inflammation. Therapy laser.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Bothrops moojeni</i> e distribuição geográfica. Fêmea procedente de Uberlândia, Estado de Minas Gerais	17
Figura 2 - Figura 2: A) Edema e equimose 2 a 3 horas após acidente botrópico. B) Edema tenso com bolha em extremidade	20
Quadro 1 - Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada	24
Quadro 2 - Geradores de laser	27
Figura 3 - Equipamento laser de baixa potência HTM	33
Figura 4 - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio dos animais administrados com veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	51
Figura 5 - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio dos animais administrados com veneno de <i>Bothrops moojeni</i> + soro	51
Figura 6 - Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio dos animais administrados com veneno de <i>Bothrops moojeni</i> + laser	52
Figura 7- Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio dos animais administrados com veneno de <i>Bothrops moojeni</i> + soro + laser	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	35
Tabela 2 - Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	35
Tabela 3 - Determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	37
Tabela 4 - Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	38
Tabela 5 - Determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	39
Tabela 6 - Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	40
Tabela 7 – Estudo do efeito do laser de Arseneto de Gálio sobre a mionecrose induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado da Dose Edematogênica Mínima do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	43
Gráfico 2 – Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	44
Gráfico 3 - Resultado da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> . Primeira fase	45
Gráfico 4 - Resultado da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> . Segunda fase	46
Gráfico 5 - Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i> . Primeira fase	47
Gráfico 6 - Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i> . Segunda fase	48
Gráfico 7 - Resultado da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	49
Gráfico 8 – Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 SERPENTES	16
2.1.1 Serpente <i>Bothrops moojeni</i>	17
2.2 VENENOS ANIMAIS	17
2.3 VENENOS DE SERPENTES	18
2.3.1 Veneno de Serpentes da família Viperidae	18
2.3.2 Veneno de Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i>	18
2.3.3 Veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	20
2.4 VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO E NAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS VENENOS BOTRÓPICOS	20
2.5 ACIDENTE BOTRÓPICO	21
2.6 O PROCESSO INFLAMATÓRIO	22
2.7 TRATAMENTO ANTIOFÍDICO	23
2.8 LASERTERAPIA DE BAIXA FREQUÊNCIA	25
2.8.1 Princípios Físicos do Laser de Baixa Potência	25
2.8.2 Características da Radiação Laser	26
2.8.3 Classificação dos Emissores de Laser	26
2.8.4 Geradores de Laserterapia	27
2.8.5 Efeitos Biológicos e Fisiológicos do Laser	28
2.8.6 Técnica de Aplicação	29
2.8.7 Laserterapia nos Acidentes Ofídicos	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 TIPO DE ESTUDO	31
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	31
4.2.1 Animais	31
4.2.2 Critérios de Inclusão	31
4.2.3 Critérios de Exclusão	32

4.2.4 Veneno	32
4.2.5 Soro Antiofídico	32
4.2.6 Laser de Baixa Potência	32
4.2.7 Equipamentos e Materiais Utilizados	33
4.3 EXPERIMENTOS	34
4.3.1 Preparação das Soluções de Veneno	34
4.3.2 Atividade Edematogênica	34
4.3.2.1 Determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	34
4.3.2.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	35
4.3.3 Atividade Nociceptiva	36
4.3.3.1 Determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	36
4.3.3.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	37
4.3.4 Infiltrado Inflamatório Muscular	38
4.3.4.1 Determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	38
4.3.4.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	39
4.3.5 Mionecrose	40
4.3.5.1 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a mionecrose induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	40
4.4 Destinação dos Animais Utilizados	42
4.5 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 RESULTADO DA DOSE EDEMATOGÊNICA MÍNIMA (DEM) DO VENENO DE <i>Bothrops moojeni</i>	43
5.2 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA	43
5.3 RESULTADO DA DOSE NOCICEPTIVA MÍNIMA (DNM) DO VENENO DE <i>Bothrops moojeni</i>	45

5.4 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA	46
5.5 RESULTADO DA DOSE INFLAMATÓRIA MÍNIMA (DIM) DO VENENO DE <i>Bothrops moojeni</i>	48
5.6 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO MUSCULAR INDUZIDO PELO VENENO DE <i>Bothrops moojeni</i>	49
5.7 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A MIONECROSE INDUZIDA PELO VENENO DE <i>Bothrops moojeni</i>	50
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A – Laudo de calibração do equipamento de laser	68
ANEXO B – Protocolo para uso de animais em pesquisa	69
ANEXO C – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa	73

1 INTRODUÇÃO

Devido apresentarem elevada freqüência e altas taxas de morbi-mortalidade, os acidentes ofídicos continuam representando um sério problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais.

As regiões brasileiras com maior incidência de acidentes ofídicos por 100.000 habitantes são as regiões Centro-Oeste e Norte. Entretanto, os dados epidemiológicos não retratam a real magnitude da região Norte, pois é possível que ocorram subnotificações de casos provavelmente devido à dificuldade de acesso da população aos serviços de saúde. No Brasil, a maioria dos acidentes ofídicos são causados por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*.

O veneno botrópico provoca efeitos locais representados por dor, edema, podendo evoluir para sangramentos e necrose, e efeitos sistêmicos representados por sangramentos, alterações cardiovasculares e renais. Também pode provocar o aumento da pressão intracompartimental, podendo levar à necrose isquêmica, déficit na cicatrização das lesões e amputação do membro.

O tratamento para acidentes botrópicos pode ser específico através da administração do soro antiofídico e geral através da elevação do membro picado, hidratação, uso de analgésicos e antibioticoterapia. Entretanto, os efeitos locais provocados pelo veneno, são muitas vezes, neutralizados apenas parcialmente pelo soro antiofídico, sendo necessário haver alternativas terapêuticas para complementar o tratamento.

Uma das técnicas fisioterapêuticas recentes que vem sendo utilizada no tratamento dos efeitos locais no acidente ofídico é a laserterapia que utiliza o laser de baixa potência no tratamento de lesões de pele, articulares, musculares e nervosas.

No entanto, há carência de pesquisas científicas que utilizem o laser de baixa potência Arseneto de Gálio no tratamento dos efeitos locais provocados pelo veneno botrópico, principalmente na fase aguda, para prevenir o agravamento das lesões e consequentemente a necrose tecidual e perda do membro.

A partir dessa problemática, foi realizado o presente estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio sobre as manifestações locais agudas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni*, através de

experimentos com camundongos da linhagem *Swiss webster*, onde foram analisadas as variáveis dependentes: atividade edematogênica e nociceptiva, infiltrado inflamatório muscular e mionecrose.

Para a organização e análise dos resultados foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$) para detectar variações dentro e entre as amostras. O processamento dos dados foi realizado pelos softwares InStat e Graph Pad Prism versão 4.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SERPENTES

As serpentes são vertebrados, tetrápodos e amniotas. Vertebrados porque apresentam vértebras; tetrápodos porque descendem de animais com quatro patas e amniotas pois nascem de ovo amniótico. São animais que pertencem ao filo Chordata, sub-filo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Serpentes. Com aproximadamente 2.700 espécies, as serpentes constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis (CARDOSO et al., 2003; FONSECA, 2010).

Têm preferência para habitar regiões temperadas e tropicais, ambientes úmidos como áreas de cultivo, matas e locais com grande quantidade de roedores. As serpentes podem ser classificadas em peçonhentas e não peçonhentas. Apresentam corpo alongado, escamas epidérmicas cobrindo todo o corpo e grande elasticidade nos movimentos cranianos. Entretanto, não tem membros locomotores, pálpebras móveis e ouvido externo (LOUREIRO, 2002; FONSECA, 2010).

Pertencem às famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae ou Colubriidae, sendo que as famílias de serpentes peçonhentas que estão presentes no Brasil são: Elapidae e Viperidae. Existem, em todo o mundo, aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo que destas, apenas 420 são consideradas peçonhentas, sendo perigosas para o homem (CASTRO, 2006; FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; FONSECA, 2010).

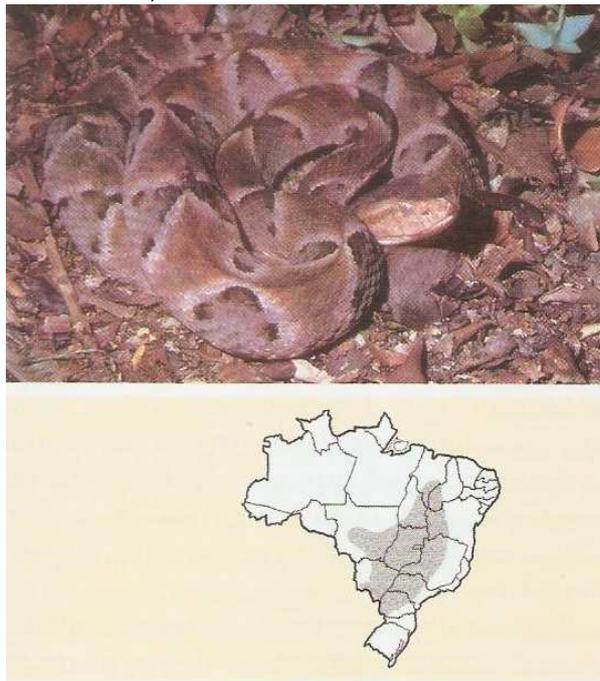
A família Elapidae apresenta aproximadamente 250 espécies no mundo todo e são conhecidas popularmente como corais verdadeiras. A família Viperidae tem cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo, sendo que no Brasil, ela apresenta 28 espécies. As viperídeas pertencentes à subfamília Crotalinae compreendem os gêneros: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. As serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, enquanto as pertencentes ao gênero *Crotalus* correspondem a 9% e as do gênero *Lachesis* e *Micrurus* com menos de 1% (LOUREIRO, 2002; FONSECA, 2010).

2.1.1 Serpente *Bothrops moojeni*

Conhecida popularmente como caíçaca, representa a principal espécie de *Bothrops* dos cerrados brasileiros, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão. Pode se adaptar bem aos ambientes modificados, possuindo comportamento agressivo e um porte avantajado, podendo atingir 1,5 metro (m) de comprimento (CARDOSO et al., 2003).

É serpente terrestre. Possui a cabeça em forma de lança, onde o dorso tem cor indefinida, sendo mais escura que o resto do corpo. A cor do dorso varia, apresentando tonalidades tipo café com leite e marron acinzentada. A língua é de cor cinza ou cinza clara. Os *canthus rostralis* e os lábios são imaculados e da mesma cor da listra occipital (LOUREIRO, 2002).

Figura 1. *Bothrops moojeni* e distribuição geográfica. Fêmea procedente de Uberlândia, Estado de Minas Gerais.



Fonte: Cardoso et al., 2003, p.49

2.2 VENENOS ANIMAIS

Os venenos de diversas espécies animais possuem toxinas que provocam o aparecimento de distúrbios hemostáticos durante o envenenamento de suas vítimas. Os componentes desses venenos podem ser classificados, de acordo com as

atividades que exercem sobre o mecanismo hemostático, em toxinas coagulantes e anticoagulantes (atuam na coagulação), toxinas agregantes e antiagregantes plaquetárias (agem diretamente sobre as plaquetas) e fatores hemorrágicos ou hemorraginas (causam lesão vascular) (CARDOSO et al., 2003).

2.3 VENENOS DE SERPENTES

Correspondem a uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas. As substâncias orgânicas são representadas pelas proteínas, carboidratos, lipídeos, aminas biologicamente ativas, peptídeos, aminoácidos e nucleotídeos. Os componentes inorgânicos encontrados são: ferro, cálcio, cobre, magnésio, potássio, cobalto, fósforo, sódio e zinco (CARDOSO et al., 2003).

2.3.1 Veneno de Serpentes da família Viperidae

As peçonhas de serpentes contêm 20 ou mais componentes diferentes, onde mais de 90% do peso seco corresponde a proteínas, com grande variedade de enzimas e uma parte não protéica composta por carboidratos, lipídios, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros (CARDOSO et al., 2003).

Os componentes do veneno das serpentes incluem cardiotoxinas, citotoxinas, fatores de crescimento de nervos, metaloproteases, lectinas, aminotransferases, inibidores enzimáticos e várias enzimas como fosfolipases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, NAD nucleosidase e B-glucosaminidases (SANTOS-FILHO, 2009).

Esses componentes são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões sistêmicas e locais. As enzimas metaloproteases e fosfolipases possuem um papel relevante, estando diretamente envolvidas com diversas alterações, tais como: dor, edema, hemorragia, distúrbio no sistema de coagulação sanguínea e necrose (GOMES et al., 2009).

2.3.2 Veneno de Serpentes do Gênero *Bothrops*

O veneno botrópico provoca efeitos locais e sistêmicos. Os locais são representados por dor e edema, no local da picada, que se instala precocemente e

evolui progressivamente, podendo aparecer também equimoses, sangramentos, enfartamento ganglionar, bolhas e necrose. Os sistêmicos podem ser sangramentos em feridas pré-existentes, alterações cardiovasculares e renais, gengivorragias, epistaxe, hematêmese, hematúria, sangramentos uterinos (grávidas), vômitos, náuseas, sudorese, hipotensão arterial e choque (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; FONSECA et al., 2004).

O veneno botrópico possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. A ação proteolítica promove lesões locais como bolhas, edema e necrose que provavelmente ocorrem devido a atividades de proteases, hialuronidases, fosfolipases, mediadores inflamatórios, ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno (RIBEIRO; JORGE, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CARDOSO et al., 2003).

Provoca inflamação e destruição desses tecidos, sendo também observado dano na parede de pequenos vasos sanguíneos. A destruição de tecidos e a inoculação de bactérias, juntamente com o veneno, podem levar à infecção e à formação de abscessos. Podem ocorrer distúrbios funcionais e perda do membro (BARBOSA et al., 2003; OLIVEIRA; RIBEIRO; JORGE, 2003).

A ação coagulante ocorre através da ativação, de forma isolada ou simultânea, do fator X e da protrombina, podendo ocorrer também alterações da função plaquetária e plaquetopenia. Já a ação hemorrágica ocorre devido à ação da hemorragina na membrana basal dos capilares provocando lesão na mesma e também devido à associação da hemorragina à plaquetopenia e alterações na coagulação, atuando tanto na região da picada, como à distância (RIBEIRO; JORGE, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CARDOSO et al., 2003).

As miotoxinas agem direta e especificamente sobre o músculo esquelético, podendo levar à degeneração e morte celular (mionecrose). A maioria dos venenos botrópicos apresentam as fosfolipases A_2 que são enzimas que hidrolizam a ligação éster de carbono 2 dos glicerolfosfolipídios, produzindo miotoxicidade, neurotoxicidade, hemólise, hipotensão, efeito anticoagulante, edema e efeitos na agregação plaquetária (CARREIRO; COGO; PRIANTI JÚNIOR, 2005; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Figura 2. A) Edema e equimose 2 a 3 horas após acidente botrópico. B) Edema tenso com bolha em extremidade.



Fonte: Cardoso et al., 2003, p. 74

2.3.3 Veneno de *Bothrops moojeni*

Foi isolada do veneno de *Bothrops moojeni* a moojeni protease A, sua principal enzima proteolítica, uma metaloprotease ativa sobre a caseína e de baixa atividade hemorrágica. Foram identificadas também, uma fosfolipase ácida, a BM-PLA₂ e uma enzima coagulante, a batroxobina (LOUREIRO, 2002).

Em estudos realizados, foi isolada nova protease a partir do veneno de *Bothrops moojeni*, a MOO3 que mostrou semelhança, em muitos aspectos, com a MSP₁, MSP₂ e MPB, mas em relação ao ponto isoelétrico, peso molecular e efeito dos inibidores, mostrou diferenças (OLIVEIRA et al., 1999).

2.4 VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO E NAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS VENENOS BOTRÓPICOS

A composição do veneno pode variar, para uma mesma espécie, em função de alguns fatores, tais como: a idade do animal, a distribuição geográfica e o caráter individual. A idade do animal pode determinar maior ou menor atividade inflamatória aguda e pró-coagulante, como por exemplo, o veneno de *Bothrops moojeni* jovem que possui maior atividade pró-coagulante e menor atividade inflamatória quando comparado com essa espécie adulta (CARDOSO et al., 2003).

O autor acima ainda afirma que em relação à distribuição geográfica, pode

haver variações nas atividades dos venenos em serpentes da mesma espécie, porém de regiões diferentes. No que concerne ao caráter individual, as serpentes da mesma espécie, idade e procedência podem apresentar variação nas atividades farmacológicas devido à dieta da região na qual se encontra.

2.5 ACIDENTE BOTRÓPICO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) há, no mundo, 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, ocorrendo 30.000 a 40.000 mortes.

O Brasil representa o país da América do Sul com maior número de acidentes ofídicos, com 20.000 casos por ano, seguido pelo Peru, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina, com número de casos por ano de 4.500; 2.500 a 3.000; 2.675; 1.200 a 1.400; 1.500 a 1.250 respectivamente (PINHO; PEREIRA, 2001; MORENO et al., 2005; LIMA; CAMPOS; RIBEIRO, 2009).

Envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* são muito importantes para a saúde pública, pois são responsáveis por aproximadamente 73,5% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil (SANTOS-FILHO et al., 2008; GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2008).

Os acidentes causados por serpentes venenosas representam importante problema de saúde pública, especialmente em países tropicais, devido às elevadas taxas de morbimortalidade. A maioria dos acidentes causados por serpentes peçonhentas ocorre em países em desenvolvimento, sendo mais frequente em áreas rurais, onde os dados epidemiológicos são poucos e subnotificados (BONAN et al., 2010).

As regiões brasileiras com maior incidência de acidentes ofídicos por 100.000 habitantes são as regiões Centro-oeste e Norte. Entretanto, os dados epidemiológicos não retratam a real magnitude da região Norte, pois é possível que ocorram subnotificações de casos provavelmente devido à dificuldade de acesso da população aos serviços de saúde (LIMA; CAMPOS; RIBEIRO, 2009).

O Ministério da Saúde notifica anualmente mais de 20.000 acidentes ofídicos, sendo que os gêneros aos quais pertencem as serpentes venenosas, no Brasil, são *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Destes, aproximadamente 85% dos

acidentes ofídicos são causados por *Bothrops* (CARDOSO et al., 2003; RIBEIRO; JORGE, 1997).

No Estado do Amapá foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde vários casos de acidentes por serpentes peçonhentas nos anos de 2003, 2004, 2005 e 2006, perfazendo um total de 909 casos. Desse total, somente em 625 casos houve referência ao gênero da serpente que causou o acidente, sendo que destes, 614 (67,5%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 6 (0,7%) por *Crotalus* e 3 (0,3%) por *Lachesis* (SILVA, 2001; LIMA; CAMPOS; RIBEIRO, 2009).

2.6 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório foi descrito inicialmente por Cornelius Celsus em termos dos sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente foi descrito por Virchow o quinto sinal cardinal: a perda da função ou *functio lesae*. Inflamação é um termo utilizado para designar um complexo fenômeno do organismo que ocorre frente a um processo infeccioso, a um antígeno ou à lesão celular ou tecidual, com o objetivo de neutralizar e expulsar o agente agressor, promovendo a reparação tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; ROCK; KONO, 2008).

No entanto, se a neutralização e destruição do agente agressor, assim como o processo de reparo tecidual não ocorrerem de forma sincronizada e eficiente, a resposta inflamatória pode provocar lesão tecidual permanente através do acúmulo de substâncias prejudiciais ao organismo, como leucócitos, colágeno e outras substâncias (NATHAN, 2002).

Os sinais cardinais presentes no processo inflamatório agudo ocorrem devido às mudanças hemodinâmicas (ou vasculares) e celulares que acontecem durante a inflamação. As mudanças hemodinâmicas são caracterizadas pela vasodilatação arteriolar e pelo aumento localizado da permeabilidade microvascular. Esses eventos são regulados pela ação de vários mediadores que são liberados durante uma lesão tecidual, na presença de alérgenos, micro-organismos patogênicos, corpos estranhos e irritantes e compostos tóxicos (MEDZHITOV, 2008).

Esse aumento da permeabilidade vascular ocorre devido a um desequilíbrio das pressões hidrostática e oncótica no plasma e tecidos, mediado pela ação de mediadores inflamatórios (histamina e serotonina), ocorrendo acúmulo de líquido no interstício, resultando em edema tecidual. A dor também está presente e ocorre

devido à ação direta dos mediadores inflamatórios (bradicinina, substância P) sobre terminações nervosas (KING, 2007).

Os mediadores inflamatórios são pequenas moléculas e proteínas que agem na amplificação e terminação de tipos diferentes de respostas inflamatórias. Atuam por meios de receptores específicos nas células-alvo, sendo que a maioria desses mediadores tem efeito em vários tipos celulares. Os mediadores inflamatórios são representados por: aminas vasoativas (histamina e serotonina); óxido nítrico; neuropeptídeos (substância P); mediadores derivados de lipídeos; citocinas; quimiocinas e cascatas de proteínas plasmáticas (cascata de complemento, da coagulação e da quinina) (KING, 2007).

Após haver lesão ou insulto ao tecido conectivo, seja devido à lesão mecânica ou à irritação química, as respostas do organismo ocorrem em etapas, sendo constituídas pela inflamação aguda, crônica e granulomatosa. O estágio agudo envolve respostas vasculares e celulares durante as primeiras 24 horas, atingindo seu pico após 48 a 72 horas. Há aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação causados pelos mediadores inflamatórios conhecidos como: histamina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, fator ativador de plaquetas, componente do complemento e substâncias liberadas nas terminações nervosas. Os neutrófilos são as células predominantes, às vezes associadas aos eosinófilos (HEDQVIST; GAUTAN; LINBOM, 2000; KISNER; COLBY, 2005; KING, 2007).

O estágio crônico surge à medida que a inflamação diminui (do segundo ao quarto dia), podendo durar de 14 a 21 dias após o surgimento da lesão, sendo caracterizado pelo aumento da atividade fibroblástica, formação de colágeno e tecido de granulação. Já no estágio crônico não existem sinais de inflamação, mas o paciente ainda não teve suas funções recuperadas completamente. Há a sobreposição com o estágio subagudo, ou seja, do 14º ao 21º dia após a lesão, ocorrendo nessa fase, a maturação do tecido conectivo devido ao desenvolvimento de fibras de colágeno e tecido cicatricial (KISNER; COLBY, 2005; KING, 2007).

2.7 TRATAMENTO ANTIOFÍDICO

O primeiro soro heterólogo para uso no tratamento do envenenamento por serpente (*Naja*) foi criado por Calmette. Anos depois, Vital Brasil produziu, em São Paulo (Instituto Butantan), soros heterólogos contra venenos de *Bothrops jararaca* e

Crotalus durissus terrificus, recomendando a administração através da via subcutânea (UTESCHER et al., 1994).

O tratamento para acidentes ofídicos corresponde ao tratamento específico e geral. O tratamento específico consiste na administração, mais precoce possível, do soro antiofídico (SAB), por via intravenosa, ou usar associações antiofídico-crotálica ou antiofídico-crotálica. O tratamento geral consiste na elevação do membro picado, no uso de analgésicos, hidratação e antibioticoterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). A posologia do soro antiofídico depende da classificação do acidente ofídico (leve, moderado e grave), de acordo com o quadro abaixo:

Quadro 1. Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada

Manifestações e Tratamento	Leve	Moderado	Grave
Locais: dor; edema e equimose	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas
Sistêmicas: hemorragia grave; choque e anúria	Ausentes	Ausentes	Presentes
Tempo Coagulação	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado	Normal ou Alterado
Soroterapia (n° de ampolas)	2-4	4-8	12
Via Administração	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa

Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

Entretanto, os efeitos locais provocados pelo veneno, são muitas vezes, neutralizados apenas parcialmente pelo soro antiofídico, sendo necessário que haja alternativas terapêuticas para complementar o tratamento desses efeitos (FONSECA et al., 2004). Isso pode ser verificado através de estudos experimentais, como o de Picolo et al., (2002) que realizaram um experimento com ratos através da indução do envenenamento local por *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, sendo os ratos tratados antes e após o envenenamento com soro antiofídico, com o objetivo de analisar a eficácia do soro no tratamento do edema e da dor no local da injeção do veneno.

Os resultados do estudo citado pelo autor acima mostraram que os antivenenos botrópicos produzidos contra *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* foram eficazes na neutralização do edema e da dor local somente quando administrados

antes do envenenamento, mostrando ineficácia quando administrados após a inoculação do veneno.

De acordo com experimentos realizados em ratos *Wistar*, foi demonstrado que o soro antibotrópico reverteu a maioria dos efeitos e distúrbios sistêmicos causados pelo veneno de *Bothrops jararaca* tais como: coagulação intensa, lesões hemorrágicas e reações inflamatórias, quando administrado simultaneamente e até 15 minutos após a injeção do veneno. No entanto, o soro não conseguiu reverter os sintomas locais como as lesões hemorrágicas, os distúrbios da coagulação, aumento da permeabilidade vascular e aumento da interação leucócito-endotélio (BATTELLINO et al., 2003).

2.8 LASERTERAPIA DE BAIXA FREQUÊNCIA

2.8.1 Princípios Físicos do Laser de Baixa Potência

O termo laser é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz através de emissão estimulada de radiação). Albert Einstein esboçou os princípios básicos da geração desse tipo de luz, em 1917, em seu trabalho intitulado *Zur Quantun Theorie der Strabing*. No entanto, foi somente em 1960 que houve o primeiro disparo de luz laser de rubi por Theodore Maiman, no Hughes Laboratories nos EUA (KITCHEN, 2003; SIMÕES, 2007).

A partir dessa década vários estudos foram sendo realizados com o laser, merecendo destaque o trabalho realizado pelo grupo do professor Endre Mester, em Budapeste (1960), que iniciou o uso do laser de baixa intensidade diretamente no tecido para fotobioestimular o processo de regeneração tecidual (KITCHEN, 2003).

Segundo Kitchen (2003) quando um átomo ou molécula recebe energia há uma mudança de órbita do elétron que se desloca de um nível mais baixo (de repouso) para outro mais alto, onde se tornam instáveis, caindo, dentro de um período curto de tempo, para níveis de energia mais baixos, fazendo com que o elétron libere sua energia extra como fótons de luz. Esses fótons de luz vão interagir com outro átomo ou molécula, provocando alteração na energia dos elétrons. A radiação laser ocorre através da Emissão Estimulada de Luz onde um fóton incide e interage com um átomo que já está excitado, produzindo dois fótons idênticos.

Para que isso ocorra, os aparelhos de tratamento por laser apresentam três componentes: um meio ativo, que quando “bombeado” com energia produz a emissão estimulada, sendo que os mais usados são as misturas de gases de Hélio e Neon (He-Ne) e os diodos de Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl). Outro componente que corresponde a uma cavidade ressonante ou câmara que contem o meio ativo e um par de superfícies refletoras paralelas ou espelhos e o terceiro que se refere a uma fonte de potência para bombear o meio ativo para produzir emissão estimulada (KITCHEN, 2003).

2.8.2 Características da Radiação Laser

O Laser que é utilizado na fisioterapia apresenta características especiais e diferentes da luz produzida por outros métodos, tais como: Monocromaticidade, Colimação e Coerência. A monocromaticidade descreve uma radiação que demonstra espectrograficamente, só uma linha, sendo que a luz produzida por um laser é de cor única. A Colimação refere-se à capacidade dos raios de luz laser serem paralelos, apresentando pouca ou nenhuma divergência da radiação emitida a distância. A Coerência significa que as depressões e picos das ondas de luz emitidas combinam-se de modo perfeito no tempo (coerência temporal) e no espaço (coerência espacial) (LOW; REED, 2001; AGNE, 2005).

2.8.3 Classificação dos Emissores de Laser

Na área médica, os emissores de laser são divididos em laser de alta potência e laser de baixa potência. São usados três tipos de emissores: sólidos (neodímio YAG); com tubo de gás (Hélio-Neon, Dióxido de Carbono (CO₂) ou Argônio) ou por meio de um diodo (Arseneto de Gálio e Arseneto de Gálio-Alumínio). De acordo com potência e perigo, os emissores de laser também podem ser classificados em categorias: I, II, IIIA, IIIB e IV (AGNE, 2005).

De acordo com Agne (2005), as categorias I e II correspondem aos emissores de laser de potência muito baixa; emitem luz vermelha visível; não tem aplicação terapêutica; não aquecem e nem produzem efeitos na pele, porém podem produzir lesões oculares. São utilizados nos leitores de códigos barras, leitores de CD e impressoras a laser.

As categorias IIIA e IIIB correspondem aos emissores de laser de potência média, normalmente inferior a 50 miliwatts (mW), com luz vermelha visível ou infravermelha invisível; não tem efeito térmico e não produzem lesões cutâneas. Contudo, podem lesionar os olhos, sendo obrigatório o uso de óculos protetores especiais. São usados na Fisioterapia conhecidos como laser de baixa intensidade, sendo que a interação com os tecidos ocorre através dos fenômenos de reflexão, refração (nas interfases), transmissão (no interior do meio), absorção e dispersão. A absorção e a transmissão dependem do comprimento de onda e da natureza absorvente (AGNE, 2005).

A Categoria IV, segundo Agne (2005), refere-se aos emissores de potência elevada, de uso médico, utilizados em cirurgias para coagulação ou corte, tratamento de tumores, eliminação do tecido superficial da pele e cauterizações em oftalmologia. Os principais são: o laser de rubi, de dióxido de carbono e YAG.

2.8.4 Geradores de Laserterapia

Atualmente os geradores de laser utilizados no Brasil são Hélio-Neon (HeNe), Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP), Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto-Gálio-Alumínio (AsGaAl), segundo o quadro abaixo:

Quadro 2. Geradores de laser

Tipo de Laser	Comprimento de onda	Forma de Emissão	Percepção do Feixe	Potência de Pico	Penetração
HeNe	632,8 nm (nanômetros)	Contínua e Pulsada	Visível (luz vermelha)	2 a 15 mW	Superficial (1 a 2 mm)
AlGaInP	670 nm	Contínua e Pulsada	Visível	15 a 30 mW	Superficial (1 a 2 mm)
AsGa	904 nm	Pulsada e Contínua	Não visível	15 a 30 mW	Mais profundo (2 a 4 mm)
AsGaAl	830 nm	Contínua e Pulsada	Não visível	30 mW	Mais profundo (2 a 4 mm)

Fonte: Agne, 2005.

Os geradores de AlGaInP são indicados especialmente em cicatrização de úlceras, enquanto que AsGa e AsGaAl são indicados para o tratamento de lesões nos tendões, músculos e ossos (AGNE, 2005).

2.8.5 Efeitos Biológicos e Fisiológicos do Laser

O tratamento com laser de baixa potência oferece um efeito reparador e benéfico sobre o tecido nervoso, o músculo esquelético e a pele. É usado na medicina devido apresentar efeitos biológicos, tais como: ação analgésica; anti-inflamatória; ação reparadora de tecido, estimulação do sistema imunológico e aumento da microcirculação sanguínea. Também tem ação bioquímica através da modulação da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, estimulando a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) (DÍAZ et al., 2009).

Descobriu-se que a irradiação laser tem uma larga aplicação na área biomédica, provocando efeitos benéficos na cicatrização de ferimento, reparo tecidual e estenose vascular. Ao nível celular, o laser provoca aumento do metabolismo oxidativo. Na China, a radiação laser de baixa potência tem sido recentemente aplicada clinicamente no tratamento de acidente vascular encefálico agudo, psoríase e artrite reumatóide. Os seus efeitos também podem ser atribuídos ao aumento da microcirculação (MI; CHEN; ZHOU, 2006).

O uso do laser de baixa potência promove aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP; regeneração do músculo esquelético após trauma; aceleração da cicatrização de feridas; estimula a neoformação de vasos sanguíneos; diminuição do processo inflamatório; indução da síntese de proteínas regulatórias nas células satélites do músculo esquelético. Pode ser usado também, no tratamento para o alívio da dor e para bioestimulação celular (BORATO et al., 2008).

Endo et al. (2008) realizaram um experimento onde provocaram lesão no nervo ciático de ratos através do esmagamento e aplicaram o laser de Arseneto de Gálio (AsGa) pulsado de baixa potência (dose 4 J/cm^2 ; comprimento de onda: 904 nm) sobre o nervo lesionado, durante 1 semana. Os pesquisadores, através da análise funcional da marcha e da morfometria dos nervos tratados, concluíram que o laser de baixa potência acelera a regeneração dos nervos lesados em ratos.

Em outro estudo experimental, os pesquisadores provocaram lesão do nervo fibular direito de ratos, através de esmagamento e realizaram o tratamento desses nervos com o uso do laser AsGaAl de baixa potência (comprimento de onda: 830 nm, potência do emissor: 100 mW, contínuo e dose de 140 J/cm^2) durante 21 dias. Os pesquisadores avaliaram o tempo de percurso na passarela de marcha e o índice

funcional do fibular, concluindo que o laser acelerou e melhorou a regeneração do nervo fibular do rato (ANDRAUS; BARBIERI; MAZZER, 2010).

2.8.6 Técnica de Aplicação

Na laserterapia de baixa potência, utiliza-se a aplicação Pontual ou a Varredura. A modalidade Pontual consiste na aplicação do laser sobre vários pontos numa determinada área. A caneta deve ficar bem próxima ou tocando a pele, devendo ficar perpendicular à área tratada. Os pontos devem ficar distanciados entre 1 e 2 centímetros (cm). Nos tipos de Lasers de luz não visível, a aplicação será sempre pontual. Na modalidade por Varredura há a demarcação de toda a área da lesão e a confecção de uma rede na qual cada quadro tenha 1cm². Esse método é aplicado somente nas lesões dermatológicas (úlceras de decúbito e diabéticas) e nas lesões para acelerar a cicatrização (AGNE, 2005).

2.8.7 Laserterapia nos Acidentes Ofídicos

Nadur-Andrade et al. (2011) realizaram um estudo com camundongos objetivando avaliar os efeitos do uso do laser de baixa potência no edema e na hemorragia local provocados pelo veneno de *Bothrops moojeni*, com aplicação de três tipos de geradores (canetas) de laser: 635 nanômetros (nm), 685 nm e 945 nm. Apresentaram como resultado redução estatisticamente significativa nos grupos onde foi administrado o soro antibotrópico associado com o laser (as três canetas).

Porém, não houve diferença estatisticamente significativa quando usaram somente o veneno com o soro antibotrópico e quando compararam os resultados entre os grupos tratados com as diferentes canetas de laser, concluindo que o laser pode reduzir os efeitos locais provocados pelo veneno de *Bothrops moojeni*, podendo ser clinicamente relevante (NADUR-ANDRADE et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio (904 nm) sobre as manifestações locais agudas induzidas pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio no edema provocado pela administração do veneno de *Bothrops moojeni*.
2. Analisar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio na atividade nociceptiva induzida pelo veneno.
3. Verificar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio no infiltrado inflamatório muscular provocado pela aplicação do veneno por via intramuscular.
4. Avaliar os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio na mionecrose local provocada pela aplicação do veneno por via intramuscular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental, exploratória, com aplicação de campo de natureza quantitativa e qualitativa, cuja pretensão foi de realizar uma coleta prospectiva, com o objetivo geral de avaliar a ação do laser Arsenêto de Gálio de baixa potência sobre os efeitos agudos locais produzidos pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

O presente estudo está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para uso científico de animais.

Essa pesquisa foi enviada à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) após o preenchimento do Protocolo para uso de animais em pesquisa (ANEXO B) e aprovada em reunião realizada no dia 09 de março de 2011, sob o protocolo nº 006A/2011, presente em anexo C. A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Toxicologia e de Fármacos do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

4.2.1 Animais

O estudo foi realizado em camundongos da linhagem *Swiss webster*, adultos, do sexo masculino, com peso corporal de 20 a 25 gramas (g), provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas localizado na cidade de Belém, Pará. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas, em temperatura ambiental de 22° Centígrados (C) ± 0,5°C; acondicionados em caixas de polietileno, com grade metálica, com comida (ração Labina) e água *ad libitum* e ciclos de luz alternados de 12 em 12 horas (MEZADRI; TOMAZ; AMARAL, 2004).

4.2.2 Critérios de Inclusão

A pesquisa incluiu somente camundongos da linhagem *Swiss webster*, do

sexo masculino, com peso compreendido entre 20 a 25 g.

4.2.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos da pesquisa todos os animais do sexo feminino devido à possibilidade dos hormônios femininos influenciarem na resposta corporal dos animais, e conseqüentemente no resultado dos experimentos e os animais que foram a óbito em decorrência dos procedimentos realizados e/ou apresentaram sofrimento incompatível com a vida.

4.2.4 Veneno

Foi utilizado o veneno bruto liofilizado de *Bothrops moojeni*, proveniente do Serpentário do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Alfenas-Minas Gerais. O veneno foi coletado pela Dr. Maria Lúcia Silva, no ano de 2009.

4.2.5 Soro Antiofídico

O soro utilizado foi o antibotrópico-laquetico produzido pelo Instituto Vital Brazil S.A., doado pelo Setor de Imunobiológico da Central de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (CADI) localizada no município de Macapá, Amapá (Lote: MS 095904 B). O soro antibotrópico-laquetico é uma solução que contém imunoglobulinas (IgG) purificadas, obtidas a partir de plasma de eqüinos hiperimunizados com mistura de venenos dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*.

É indicado para o tratamento do envenenamento causado pela picada de serpente do gênero *Bothrops* (*B.*) (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) e da serpente *Lachesis muta*. Não é recomendado nos acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus* (cascavel e boicininga) e *Micrurus* (coral).

A via de administração do soro nos experimentos foi a intraperitoneal e a dose foi de 60 microlitros (μL) (NADUR-ANDRADE et al., 2011).

4.2.6 Laser de Baixa Potência

Aparelho de laser semiconductor de baixa potência, HTM Compact (Amparo,

São Paulo, Brasil), caneta com comprimento de onda de 904 nm. Os parâmetros do laser foram: potência de 50 mW, tempo de irradiação de 25 segundos (determinado pelo aparelho) e área irradiada de 2 cm², com dose de 4 J/cm². A técnica aplicada foi a Pontual, onde a irradiação do laser foi realizada no local onde o veneno foi administrado, através do contato direto da caneta na pele do animal, formando um ângulo perpendicular com a mesma. Foram usados óculos para proteção. O aparelho de laser foi calibrado através do uso do medidor de potência ótica Ophir PULSAR (HTM-EIME-017) (ANEXO A). A dose usada nos experimentos (4 J/cm²) não provoca efeitos térmicos, sendo a dose mais empregada em clínicas de fisioterapia, de acordo com pesquisa realizada por Fukuda et al. (2010). Esses parâmetros foram usados em todos os experimentos.

Figura 3. Equipamento laser de baixa potência HTM



Fonte: Pesquisa realizada pelo autor.

4.2.7 Equipamentos e Materiais Utilizados:

Balança eletrônica (Bioprecisa modelo FA-2104N).
 Balança (Acculab).
 Caneta para CD/DVD.
 Pipetador automático (volume fixo) (Kacil).
 Pipetador Automático (volume variável).
 Tubos de Ependorf.
 Seringa para insulina descartável de 1ml/cc, U-100.
 Cloreto de Sódio 0,9%.
 Luvas descartáveis.

Paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mitutoyo).
Laser de baixa potência (HTM, caneta de 904 nm).
Funil de Vidro.
Espelho (tamanho médio).
Óculos para proteção
Máquina Fotográfica (Sony, com 7.2 megapixels).
Algodão Hidrófilo branco (Johnson & Johnson).
Cronômetro (Kenko, modelo KK-2808).
Tripé (WK 1008).
Soro antibotrópico-laquéutico (Instituto Vital Brazil S.A.).
Tubo de ensaio.
Lâmina para microscópio (Labor Slides).
Material Cirúrgico (tesoura, pinça).
Placas de Petri
Microscópio óptico (Diagtech).
Formaldeido
Gaze.
Becker.
Líquido de Turk.
Câmara de Neubauer Improved (Optik Labor).
Ponteira para pipeta.

4.3 EXPERIMENTOS

4.3.1 Preparação das Soluções de Veneno

Inicialmente o veneno bruto liofilizado de *Bothrops moojeni* foi pesado em uma balança analítica (Bioprecisa) e diluído em solução salina estéril.

4.3.2 Atividade Edematogênica

Para a análise desta atividade, o experimento foi dividido em duas etapas: a primeira foi a determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) do veneno de *Bothrops moojeni* e a segunda foi o estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

4.3.2.1 Determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Primeiramente foi determinada a menor dose de veneno capaz de produzir edema na pata dos camundongos quando comparado aos animais do grupo controle. Para isso, foram utilizados camundongos distribuídos em 4 grupos, contendo 5 animais em cada, aos quais foram administradas diferentes doses de

veneno de *Bothrops moojeni* (Tabela 1). Posteriormente, os animais foram imobilizados manualmente e o veneno foi injetado na região subplantar da pata posterior direita, por via intradérmica. O volume da pata foi avaliado através do uso de um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mitutoyo), nos intervalos de 0h (antes do veneno); 1h; 2h; 3h e 4 horas após a administração do veneno. Foram realizadas 3 medidas para o cálculo da média de volume da pata de cada animal.

Tabela 1. Determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	SSE	Veneno
I	50µL	–
II	–	0,05 mg/kg
III	–	0,10 mg/kg
IV	–	0,20 mg/kg

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. SSE- Solução salina estéril; n=5; Volume de veneno administrado: 50µL.

4.3.2.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Nesta etapa, a dose de veneno utilizada para a indução do edema foi de 0,05 mg/kg. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, contendo 5 camundongos cada, totalizando 25 animais. Foi realizada imobilização manual para a administração intradérmica do veneno de *Bothrops moojeni*, na região subplantar da pata posterior direita (Tabela 2).

Tabela 2. Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	Veneno (mg/Kg)	Soro (µL)	Laser (J/cm ²)
SSE	–	–	–
VBM	0,05	–	–
VS	0,05	60	–
VL	0,05	–	4
VSL	0,05	60	4

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. *SSE- Solução salina estéril; 50 µL.

De acordo com a tabela acima, o grupo SSE correspondeu ao grupo controle que recebeu somente solução salina estéril (50 µL); o grupo VBM recebeu apenas o

veneno; o grupo VS recebeu o veneno e o soro (30 minutos após o veneno); o grupo VL recebeu o veneno e o laser (30 minutos após o veneno) e o grupo VSL recebeu o veneno, o soro (30 minutos após o veneno) e o laser imediatamente após o soro.

O laser foi aplicado inicialmente 30 minutos após o veneno (grupo VL) e imediatamente após o soro (grupo VSL). Posteriormente foi usado duas vezes ao dia durante 3 dias consecutivos (1h, 6h, 24h, 30h, 48h, 54h e 72 h após o veneno). Após cada aplicação do laser foi realizada a mensuração do volume da pata dos animais.

O edema foi avaliado através do uso de um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (Mitutoyo), nos intervalos de 0h (antes do veneno); 1h; 2h; 3h; 4h; 6h; 24h; 30h; 48h; 54h e 72h após a administração do veneno.

4.3.3 Atividade Nociceptiva

Para a análise desta atividade, o experimento foi dividido em duas etapas: a primeira para a determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de *Bothrops moojeni* e a segunda para o estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

4.3.3.1 Determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Primeiramente, foi determinada a menor dose de veneno capaz de provocar resposta álgica na pata dos camundongos quando comparado com o grupo controle. Para isso, foram utilizados camundongos distribuídos em 4 grupos, contendo 5 animais em cada. Posteriormente, os animais foram imobilizados manualmente e o veneno ou a solução salina estéril foram administrados por via subcutânea na região intraplantar da pata posterior direita (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	SSE	Veneno
I	50 μ L	–
II	–	0,05 mg/kg
III	–	0,10 mg/kg
IV	–	0,20 mg/kg

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. SSE- Solução salina estéril; n=5; Volume de veneno administrado: 50 μ L.

A atividade nociceptiva foi avaliada imediatamente após a administração da solução salina estéril ou do veneno de *Bothrops moojeni* nas diferentes concentrações (0,05 mg/Kg; 0,10 mg/Kg e 0,20 mg/Kg). A atividade nociceptiva foi realizada de acordo com Soares et al. (2009) que fizeram uma adaptação do Método descrito por Hunskaar et al. (1985), onde os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, localizados sobre uma superfície refletora para facilitar a observação. Em seguida, foi medida a reatividade dos animais, considerada como o tempo gasto, em segundos, em que os animais lamberam ou morderam a pata injetada, durante os 5 minutos iniciais (primeira fase) e no intervalo de 20 a 30 minutos (segunda fase) após a administração do veneno.

4.3.3.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Nesta etapa, a dose de veneno utilizada para a indução da atividade nociceptiva foi de 0,20 mg/kg. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, contendo 5 camundongos em cada, totalizando 25 animais. Foi realizada imobilização manual para a administração subcutânea do veneno de *Bothrops moojeni*, na região intraplantar da pata posterior direita (Tabela 4).

Tabela 4. Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	Veneno (mg/Kg)	Soro (μL)	Laser (J/cm^2)
SSE	–	–	–
VBM	0,20	–	–
VS	0,20	60	–
VL	0,20	–	4
VSL	0,20	60	4

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. *SSE- Solução salina estéril; 50 μL .

De acordo com a tabela acima, o grupo SSE correspondeu ao grupo controle que recebeu somente solução salina estéril (50 μL); o grupo VBM recebeu apenas o veneno; o grupo VS recebeu o veneno e o soro (imediatamente após o veneno); o grupo VL recebeu o veneno e o laser (imediatamente após o veneno) e o grupo VSL recebeu o veneno, o soro (imediatamente após o veneno) e o laser (imediatamente após o soro).

A atividade nociceptiva foi avaliada logo após a administração do veneno, do soro e do laser, nos grupos correspondentes, através do modelo utilizado por Soares et al. (2009) que fizeram uma adaptação do Método descrito por Hunskaar et al. (1985), explicado anteriormente.

4.3.4 Infiltrado Inflamatório Muscular

Para a análise desta atividade, o experimento foi dividido em duas etapas, sendo a primeira a determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de *Bothrops moojeni* e a segunda o estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório no músculo induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

4.3.4.1 Determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Primeiramente foi determinada a menor dose de veneno capaz de induzir o infiltrado inflamatório no músculo gastrocnêmio da pata dos animais quando comparado com os animais do grupo controle, administrados somente com solução salina estéril. Para isso, foram utilizados camundongos distribuídos em 4 grupos, contendo 5 animais em cada. Os animais foram imobilizados manualmente para a

realização da tricotomia e para a administração do veneno, em diferentes doses por via intramuscular, no músculo gastrocnêmio da pata esquerda (Tabela 5).

Tabela 5. Determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	SSE	Veneno
I	50 μ L	–
II	–	0,05 mg/kg
III	–	0,10 mg/kg
IV	–	0,20 mg/kg

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. SSE- Solução salina estéril; n=5; Volume de veneno administrado: 50 μ L.

Após 12 horas da injeção da solução salina estéril e do veneno nos grupos correspondentes, os camundongos foram submetidos à eutanásia na câmara de CO₂ e o músculo gastrocnêmio esquerdo de cada animal foi ressecado e cortado com uma lâmina em pedaços muito pequenos antes da adição de 2 ml de Solução Salina Tamponada (PBS). Depois a suspensão foi incubada por 30 minutos a 4°C. Em seguida, a suspensão foi filtrada através de uma gaze, sendo lavada com um adicional de 1 ml de solução salina, sendo colocada em tubos de ensaio e identificados. Depois disso, uma fração de solução filtrada foi diluída em líquido de Turk (1:20), sendo retirados 20 μ l para a contagem total dos leucócitos em câmara de Neubauer (BARBOSA et al., 2008).

4.3.4.2 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Nesta etapa, a dose de veneno utilizada para induzir o infiltrado inflamatório no músculo gastrocnêmio esquerdo foi de 0,10 mg/Kg. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, contendo 5 camundongos em cada, totalizando 25 animais. Foi realizada imobilização manual, e realização da tricotomia para a administração intramuscular do veneno de *Bothrops moojeni*, no músculo gastrocnêmio da pata esquerda (Tabela 6).

Tabela 6. Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	Veneno (mg/Kg)	Soro (μL)	Laser (J/cm^2)
SSE	–	–	–
VBM	0,10	–	–
VS	0,10	60	–
VL	0,10	–	4
VSL	0,10	60	4

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. *SSE- Solução salina estéril; 50 μL .

De acordo com a tabela acima, o grupo SSE correspondeu ao grupo controle que recebeu somente solução salina estéril (50 μL); o grupo VBM recebeu apenas o veneno; o grupo VS recebeu o veneno e o soro (30 minutos após o veneno); o grupo VL recebeu o veneno e o laser (30 minutos após o veneno) e o grupo VSL recebeu o veneno, o soro (30 minutos após o veneno) e o laser imediatamente após o soro.

O laser foi aplicado inicialmente 30 minutos após o veneno (grupo VL) e imediatamente após o soro (grupo VSL). Posteriormente foi usado duas vezes ao dia durante 3 dias consecutivos (1h, 6h, 24h, 30h, 48h, 54h e 72 h após o veneno). Após 72 horas, os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de CO_2 para a realização da quantificação do infiltrado inflamatório do músculo gastrocnêmio esquerdo, através da técnica utilizada por Barbosa et al. (2008) explicada anteriormente.

4.3.5 Mionecrose

Para a análise desta atividade, foi usada a Dose Inflamatória Mínima de 0,10 mg/Kg para o estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

4.3.5.1 Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Nesta etapa, a dose de veneno utilizada para produzir a mionecrose foi de 0,10 mg/Kg. Os animais foram distribuídos em 5 grupos, contendo 5 camundongos em cada, totalizando 25 animais. Foi realizada imobilização manual, tricotomia e,

em seguida a administração intramuscular do veneno de *Bothrops moojeni*, no músculo gastrocnêmio da pata esquerda (Tabela 7).

Tabela 7. Estudo do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*

Grupo	Veneno (mg/Kg)	Soro (μ L)	Laser (J/cm^2)
SSE	–	–	–
VBM	0,10	–	–
VS	0,10	60	–
VL	0,10	–	4
VSL	0,10	60	4

Fonte: Pesquisa realizada pelo autor. *SSE- Solução salina estéril; 50 μ L.

De acordo com a tabela acima, o grupo SSE correspondeu ao grupo controle que recebeu somente solução salina estéril (50 μ L); o grupo VBM recebeu apenas o veneno; o grupo VS recebeu o veneno e o soro (30 minutos após o veneno); o grupo VL recebeu o veneno e o laser (30 minutos após o veneno) e o grupo VSL recebeu o veneno, o soro (30 minutos após o veneno) e o laser imediatamente após o soro.

O laser foi aplicado inicialmente 30 minutos após o veneno (grupo VL) e imediatamente após o soro (grupo VSL). Posteriormente foi usado duas vezes ao dia durante 3 dias consecutivos (1h, 6h, 24h, 30h, 48h, 54h e 72 h após o veneno).

A mionecrose foi avaliada com base nas alterações morfológicas induzidas pela injeção do veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio esquerdo. Após 72 horas da administração do veneno, os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de CO₂. Em seguida, o músculo gastrocnêmio esquerdo foi ressecado e colocado em solução fixadora (formaldeído tamponado). Depois o material foi enviado ao Laboratório de Patologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, localizado na cidade de Belém-Pará, onde foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e processados para inclusão em parafina. Os blocos resultantes de parafina foram cortados em 2.5 μ m (micrômetros) de espessura, sendo posteriormente corados com hematoxilina e eosina. A análise das lâminas foi feita através de um microscópio (SANTOS-FILHO et al., 2008).

4.4 Destinação dos Animais Utilizados

Os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de CO₂ (Laboratório de Fármacos). Esses animais foram descartados com os resíduos biológicos da UNIFAP através de uma empresa especializada (MVB Serviços) para que fossem incinerados.

4.5 Análise Estatística

Média e erro padrão foram calculados em cada grupo. Os dados foram organizados e analisados através da aplicação da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey-Kramer, com nível de significância estatística de 5% ($p < 0.05$) para detectar variações dentro e entre as amostras. O processamento dos dados foi realizado pelos softwares InStat e Graph Pad Prism.

5 RESULTADOS

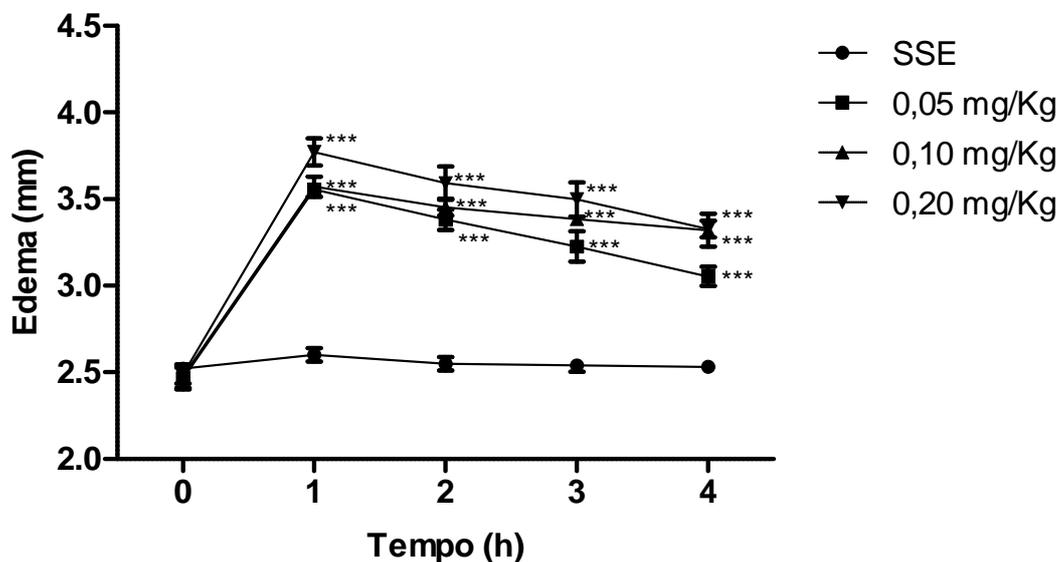
5.1 RESULTADO DA DOSE EDEMATOGÊNICA MÍNIMA (DEM) DO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Os animais foram divididos em 4 grupos, onde foram administradas doses diferentes do veneno de *Bothrops moojeni* (0,05 mg/Kg; 0,10 mg/Kg; 0,20 mg/Kg; controle: SSE) para a análise da menor dose de veneno capaz de induzir o edema na pata direita dos animais.

Todas as doses de veneno promoveram um aumento significativo do edema de pata quando comparado com o grupo controle (SSE), mostrando que a DEM foi de 0,05 mg/Kg.

Os resultados mostraram-se significativamente diferentes do controle (SSE), para $p < 0.001$ (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Resultado da Dose Edematogênica Mínima do veneno de *Bothrops moojeni*.



Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Grupo controle: SSE (Solução Salina Estéril). *** $p < 0.001$ (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.2 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENATO DE GÁLIO SOBRE A ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA

Os animais foram divididos em 5 grupos, onde foi administrada a dose de 0,05 mg/Kg do veneno de *Bothrops moojeni* para a avaliação dos efeitos do laser

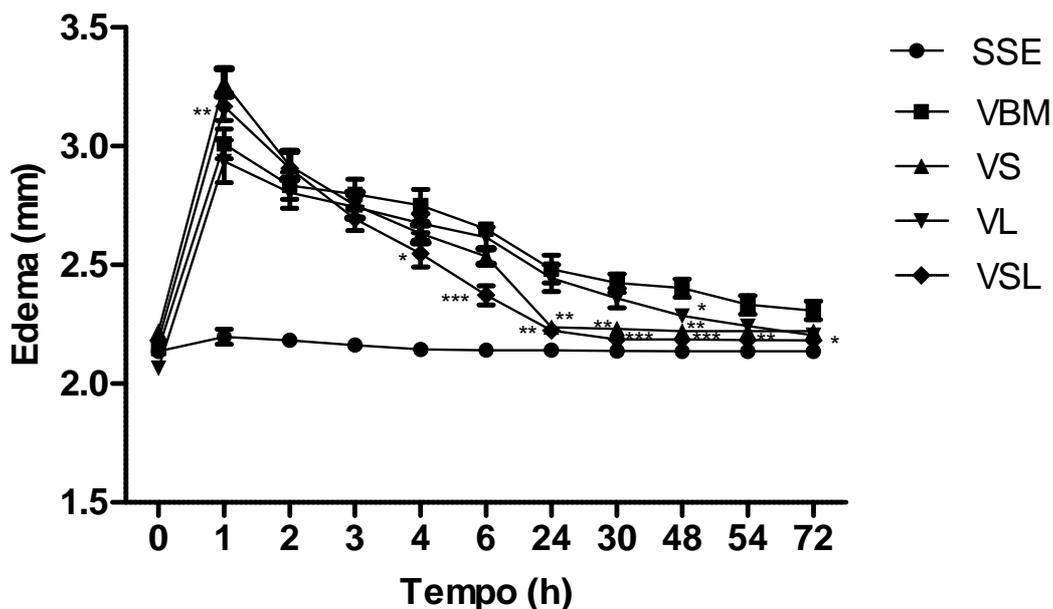
Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica durante 72 horas de experimento.

Na primeira hora após a administração do veneno, houve diferença significativa apenas entre os grupos VS e VL, com redução de 22,76% do edema do grupo VL em relação ao grupo VS. Após 6 horas, houve redução de 10,5% do edema de pata do grupo VSL em relação ao VBM; de 6,47% do grupo VSL em relação ao VS e de 9,33% do grupo VSL em relação ao VL.

Após 24 horas houve redução de 9,84% do grupo VS e de 10,4% do grupo VSL quando comparados ao VBM. Também houve redução do edema de pata de 8,43% do grupo VS em relação ao VL e de 9,01% do grupo VSL quando comparado ao grupo VL. Após 48 horas, houve redução estatisticamente significativa de todos os grupos quando comparados ao grupo controle (VBM), porém não houve redução significativa do edema de pata entre os animais dos grupos VS, VL e VSL.

Depois de 72 horas, houve somente redução significativa do edema de pata em 5,46% do grupo VSL em relação ao grupo controle (VBM). Não houve redução significativa entre os animais dos grupos VS, VL e VSL (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*.



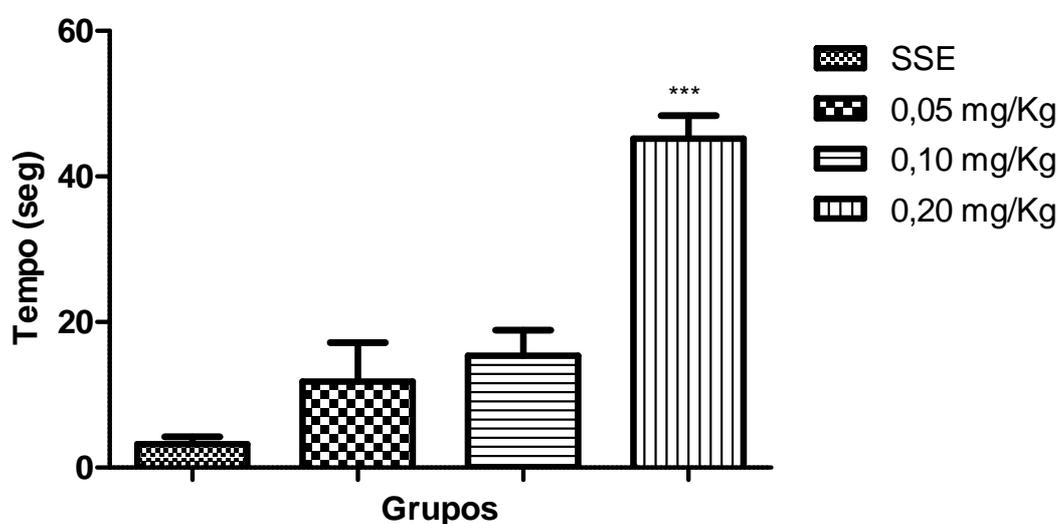
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. SSE (Solução Salina Estéril); VBM (Veneno de *Bothrops moojeni*); VS (Veneno+soro); VL (Veneno+laser); VSL (Veneno+soro+laser). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.3 RESULTADO DA DOSE NOCICEPTIVA MÍNIMA (DNM) DO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Os animais foram divididos em 4 grupos, aos quais foram administradas doses diferentes do veneno de *Bothrops moojeni* (0,05 mg/Kg; 0,10 mg/Kg; 0,20 mg/Kg; controle: SSE) para a análise da menor dose de veneno capaz de induzir a nocicepção na pata direita dos animais. A atividade nociceptiva foi dividida em duas fases, sendo a primeira de 0 a 5 minutos e segunda de 20 a 30 minutos após a administração do veneno.

O gráfico 3 mostra que na primeira fase da atividade nociceptiva, somente o grupo 0,20 mg/Kg mostrou diferença significativa ($p < 0.001$) quando comparado ao grupo controle (SSE).

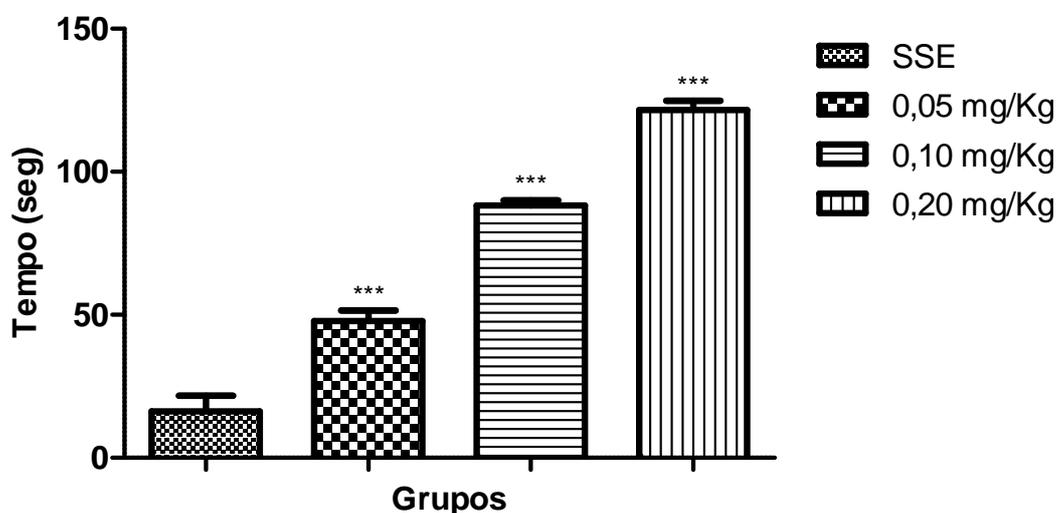
Gráfico 3 – Resultado da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de *Bothrops moojeni*. Primeira fase.



Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. 1º Fase. Grupo controle: SSE (Solução Salina Estérel). *** $p < 0.001$ (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

O gráfico 4 mostra que na segunda fase, os três grupos apresentaram diferença significativa. Através da análise das duas fases, verificou-se que a DNM foi de 0,20 mg/Kg.

Gráfico 4 – Resultado da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) do veneno de *Bothrops moojeni*. Segunda fase.



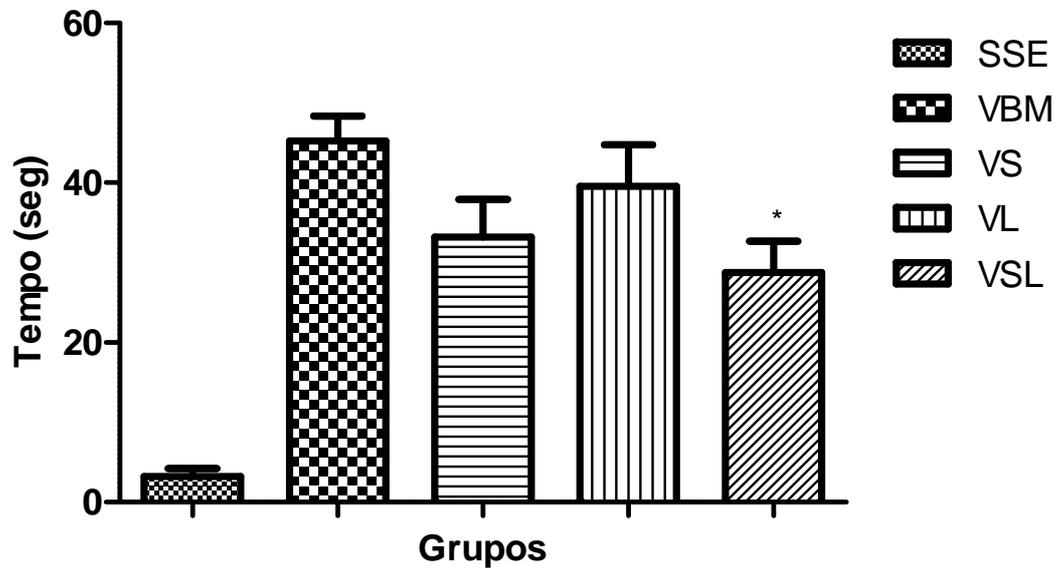
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. 2º Fase. Grupo controle: SSE (Solução Salina Estéril). *** $p < 0.001$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.4 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA

Os animais foram divididos em 5 grupos, onde foi administrada a dose de 0,20 mg/Kg do veneno de *Bothrops moojeni* para a avaliação dos efeitos do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva durante 30 minutos após a administração do veneno, sendo dividida em duas fases: 0 a 5 minutos (1ª Fase) e 20 a 30 minutos (2ª Fase).

Observou-se que na primeira fase da atividade nociceptiva, somente o grupo VSL mostrou diferença significativa ($p < 0.05$), ocorrendo redução no tempo de mordida e lambida da pata injetada com o veneno em 36,29 % em relação ao grupo controle (VBM). Não houve diferença significativa entre os animais dos grupos VS, VL e VSL (Gráfico 5).

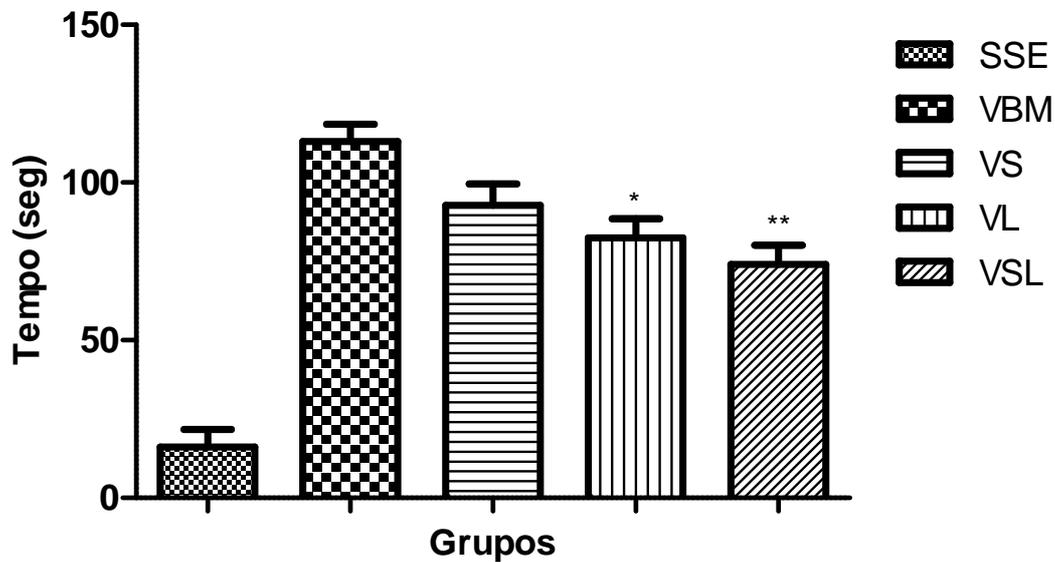
Gráfico 5 – Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Primeira fase.



Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. SSE (Solução Salina Estéril); VBM (Veneno de *Bothrops moojeni*); VS (Veneno+soro); VL (Veneno+laser); VSL (Veneno+soro+laser). * $p < 0,05$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

Na segunda fase, os grupos VL e VSL, quando comparados ao grupo VBM, tiveram diferença estatisticamente significativa na redução da atividade nociceptiva, com redução no tempo de mordida e lambida da pata injetada com o veneno em 27,08% e 34,52%, respectivamente. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos VS, VL e VSL (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Segunda fase.



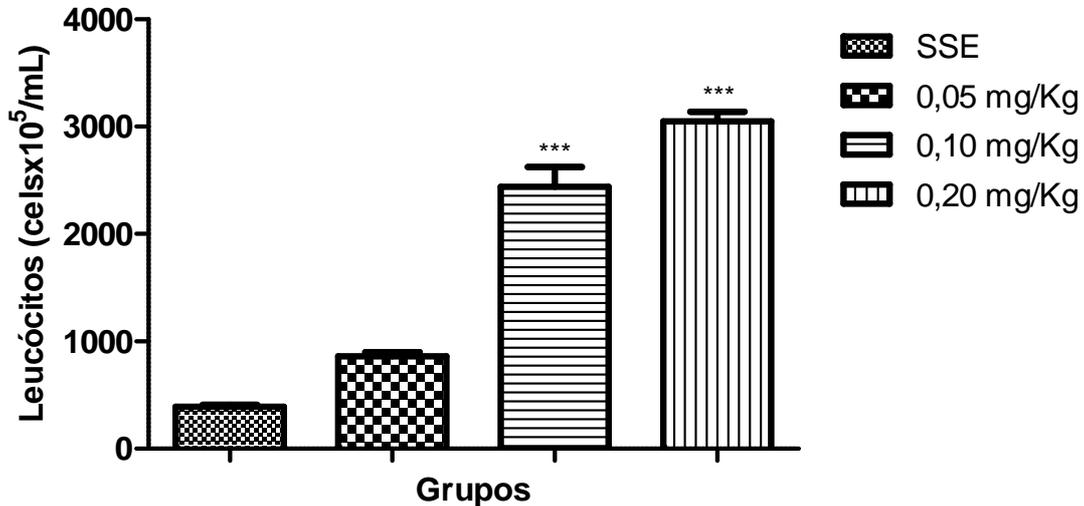
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. SSE (Solução Salina Estérel); VBM (Veneno de *Bothrops moojeni*); VS (Veneno+soro); VL (Veneno+laser); VSL (Veneno+soro+laser). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.5 RESULTADO DA DOSE INFLAMATÓRIA MÍNIMA (DIM) DO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Os animais foram divididos em 4 grupos, onde foram administradas doses diferentes do veneno de *Bothrops moojeni* (0,05 mg/Kg; 0,10 mg/Kg; 0,20 mg/Kg; controle: SSE) para a análise da menor dose de veneno capaz de induzir inflamação muscular no músculo gastrocnêmio esquerdo em camundongos.

O gráfico 7 mostra que somente as doses de veneno de 0,10 mg/Kg e 0,20 mg/Kg promoveram um aumento significativo na quantidade total de leucócitos presentes no infiltrado inflamatório muscular quando comparado ao grupo controle (SSE). A menor dose que apresentou uma diferença estatisticamente significativa foi 0,10 mg/Kg ($p < 0.001$).

Gráfico 7 – Resultado da Dose Inflamatória Mínima (DIM) do veneno de *Bothrops moojeni*.



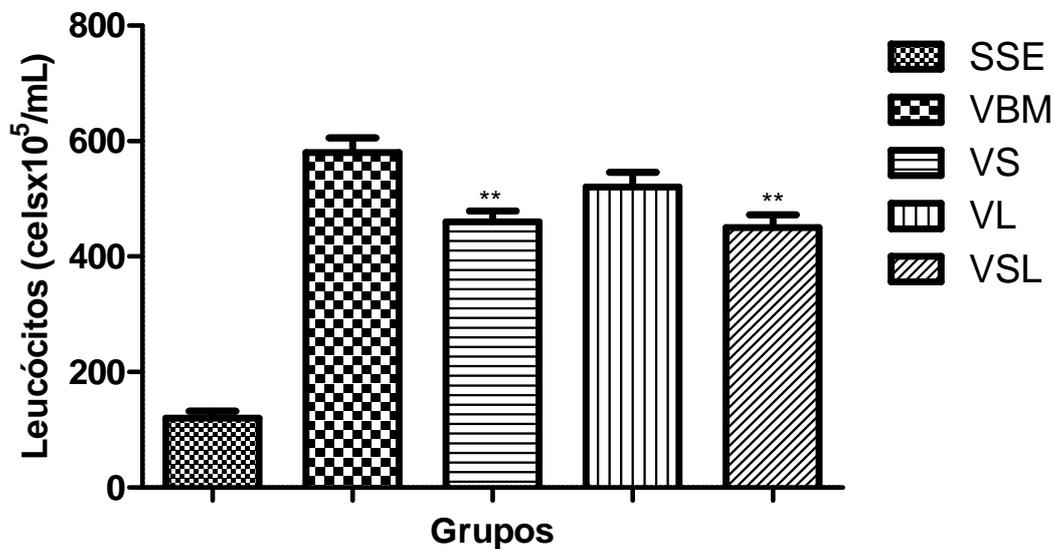
Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. Grupo controle: SSE (Solução Salina Estérel). *** $p < 0.001$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.6 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO MUSCULAR INDUZIDO PELO VENENO DE *Bothrops moojeni*

Os animais foram divididos em 5 grupos, aos quais foi administrada a dose de 0,10 mg/Kg do veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio esquerdo para a avaliação da ação do laser de Arseneto de Gálio sobre o infiltrado inflamatório muscular.

Após 72 horas da administração do veneno, foi realizada a contagem total de leucócitos do infiltrado inflamatório muscular, onde houve redução estatisticamente significativa no número total de leucócitos em 20,69% no grupo VS e em 22,42% no grupo VSL em relação ao grupo controle (VBM). Não houve redução significativa do infiltrado inflamatório entre os animais dos grupos VS, VL e VSL (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Resultado do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a quantificação do infiltrado inflamatório muscular induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*.



Fonte: Dados provenientes da pesquisa realizada pelo autor. SSE (Solução Salina Estéril); VBM (Veneno de *Bothrops moojeni*); VS (Veneno+soro); VL (Veneno+laser); VSL (Veneno+soro+laser). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média \pm erro padrão de 5 animais.

5.7 RESULTADO DO EFEITO DO LASER ARSENETO DE GÁLIO SOBRE A MIONECROSE INDUZIDA PELO VENENO DE *Bothrops moojeni*

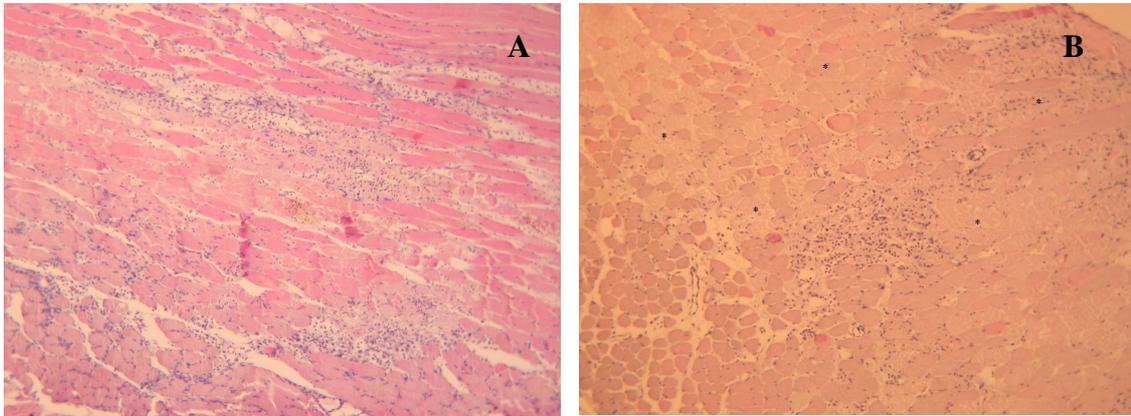
Os animais foram divididos em 5 grupos, onde foi administrada a mesma dose do veneno de *Bothrops moojeni* usada no infiltrado inflamatório muscular (0,10 mg/Kg). Essa dose foi injetada no músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos para a avaliação do efeito do laser Arseneto de Gálio sobre a mionecrose.

Após 72 horas da administração do veneno, os animais foram submetidos à eutanásia para a ressecção do músculo gastrocnêmio esquerdo e preparação das lâminas para estudo morfológico.

Após leituras das lâminas, observou-se no grupo I (SSE) normalidade tecidual na estrutura conjuntiva e de miócitos em 100% (5 lâminas).

No grupo II (veneno de *B. moojeni*) ocorreu miosite necrótica (mionecrose) segmentar em 100% (5) das lâminas, com hialinização, ondulação e floculação de fibras musculares. Houve infiltração moderada de polimorfonucleares e macrófagos predominantemente (Figura 4).

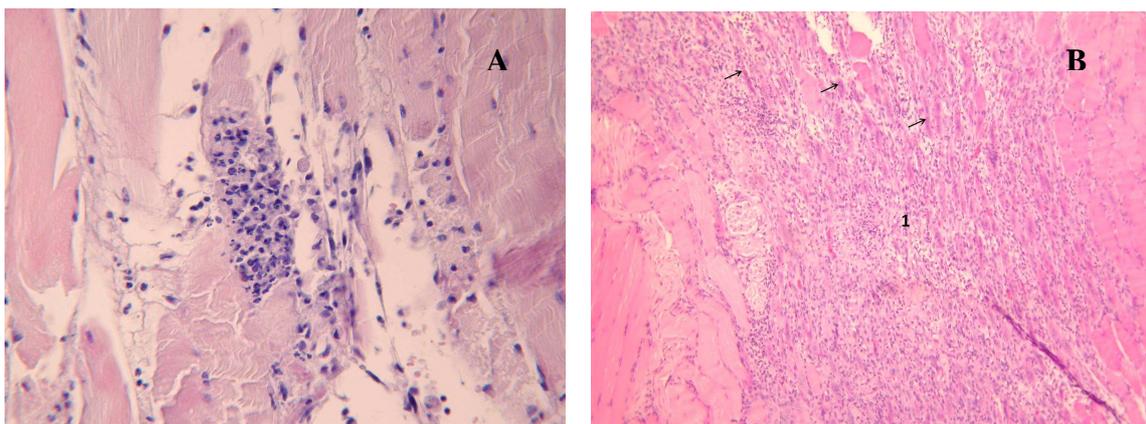
Figura 4. Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animais administrados com veneno de *Bothrops moojeni*



Fonte: Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Figura A: Tecido muscular com necrose e infiltrado inflamatório em apresentação multifocal. Hematoxilina/Eosina (HE). Obj. 10x. Figura B: processo inflamatório necrótico envolvendo extensa área do tecido muscular (*). HE. Obj. 10x

No grupo III (veneno+soro) verificou-se fasciculite moderada (40%), lesão multifocal caracterizada por necrose segmentar (40%), área extensa de necrose (40%), inflamação com predominância de neutrófilos e macrófagos em fagocitose (100%) e regeneração de fibras musculares (100%) (Figura 5).

Figura 5. Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animais administrados com veneno de *Bothrops moojeni* + soro.

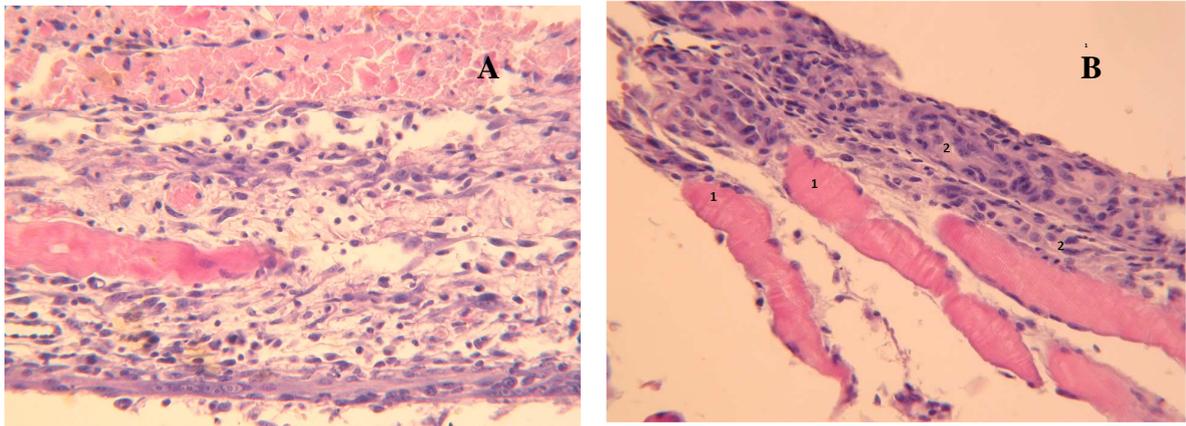


Fonte: Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Figura A: mionecrose com fibra muscular infiltrada por neutrófilos (piocitos). HE, Obj. 40x. Figura B: Tecido muscular apresentando extensa necrose com inflamação associada. Presença de regeneração de fibras musculares (setas). HE. Obj. 10x.

No grupo IV (veneno+laser), ocorreu fasciculite moderada (40%), necrose

segmentar (20%), extensa necrose segmentar (60%), inflamação notável com presença de neutrófilos e macrófagos (80%), presença de regeneração (100%) (Figura 6).

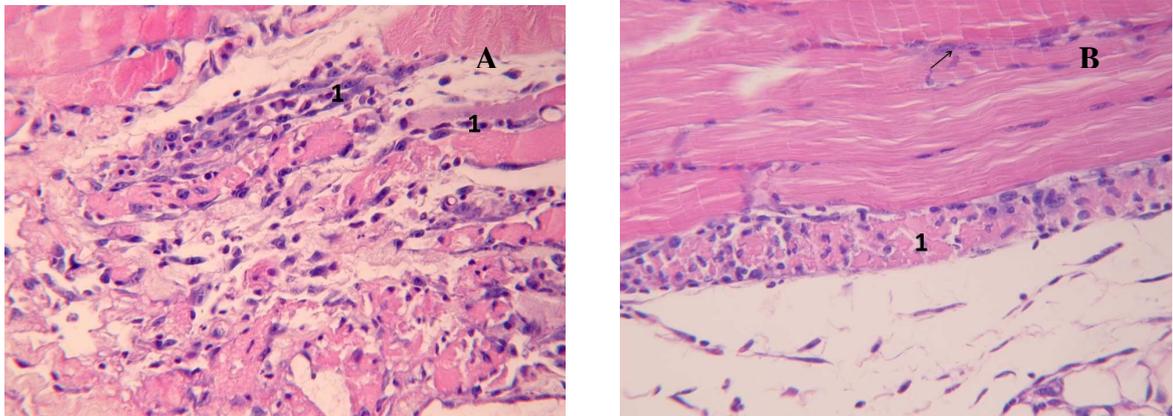
Figura 6. Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animais administrados com veneno de *Bothrops moojeni* + laser.



Fonte: Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Figura A: extensa necrose segmentar com fragmentação (floculação) de miócitos. A inflamação mostrou predominância de neutrófilos e macrófagos. A regeneração mostrou-se expressiva, com grande hiperplasia de células satélites (setas) HE, Obj. 40x. Figura B: área muscular com fibras em regeneração. Nota-se o processo no prolongamento de algumas fibras (1) e em segmentos isolados (2). HE, Obj. 40x.

No grupo V (veneno+soro+laser), observou-se necrose segmentar multifocal (60%), necrose segmentar de pequena dimensão (20%), inflamação leve com predominância de neutrófilos e macrófagos (80%), regeneração muscular (40%), regeneração expressiva, com grande hiperplasia de células satélites (40%) (Figura 7).

Figura 07. Fotomicrografia do músculo gastrocnêmio de animais administrados com veneno de *Bothrops moojeni* + soro + laser.



Fonte: Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia. Figura A: mostra necrose segmentar com fragmentação de fibras musculares. Proliferação de células satélites e regeneração de fibras musculares (1). HE, Obj. 40x. Figura B: Nas margens do músculo algumas fibras fragmentadas com macrófagos (1). Observou-se fibras musculares com múltiplos núcleos volumosos, dispendo-se centralmente a fibra e enfileirados (seta), características de regeneração muscular avançada. HE, Obj. 40x.

6 DISCUSSÃO

Os envenenamentos causados por acidentes de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* provocam efeitos locais e sistêmicos. Dentre os efeitos locais tem-se: inflamação tecidual local, com dor e edema, necrose do músculo esquelético e de pele, hemorragia e bolhas. O tratamento utilizado deve ser o soro antiofídico que neutraliza completamente os efeitos sistêmicos, porém apenas parcialmente os efeitos locais, sendo importante o estudo de novas alternativas terapêuticas que complementem a soroterapia (SILVA et al., 2007; NADUR-ANDRADE et al., 2011).

Queiroz e colaboradores (2008) analisaram as características bioquímicas e biológicas de 19 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* e a habilidade do antiveneno para neutralizar a atividade proteolítica desses venenos. Os resultados mostraram que o soro antibotrópico não conseguiu neutralizar totalmente as atividades tóxicas de todos os venenos analisados e sugeriram a inclusão de outros venenos na mistura para a preparação do soro para que ele seja totalmente efetivo.

Canabrava et al. (2008) mostraram que a miotoxina BmTx da serpente de *Bothrops moojeni* foi capaz de induzir o edema e a hiperalgesia e que a utilização de alguns fármacos (dexametasona, meloxicam, indometacina e prometazina) foram eficazes na redução desses efeitos, corroborando o presente estudo na utilização de alternativas terapêuticas para complementar o tratamento dos efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

Outras alternativas terapêuticas tem sido propostas para complementar o tratamento dos efeitos locais provocados pelo veneno botrópico, como o uso de extratos de plantas (da SILVA, 2001; da SILVA, 2005; CAVALCANTE et al., 2007), drogas sintéticas (LOMONTE et al., 2009) e laser de baixa potência (BARBOSA et al., 2008).

O laser de baixa potência age na microcirculação, atuando no esfíncter pré-capilar, provocando vasodilatação e reabsorção de exsudato e na corrente sanguínea, aumentando a velocidade de circulação. Também atua no sistema fibrinolítico, favorecendo a eliminação dos microtrombos. Além disso, ocasiona aumento da fagocitose pelo aumento do número de macrófagos e de oxigênio, atuando como biomodulador ou normalizante celular (DÍAZ et al., 2009).

Há na literatura, vários estudos que utilizaram o laser de baixa potência no

tratamento do edema e dor em lesão muscular induzida por formalina, na regeneração nervosa, na regeneração muscular traumática, nas lesões de pele e nos efeitos inflamatórios induzidos por carragenina (ALBERTINI et al., 2004; BORATO et al., 2008; SOUSA et al., 2009; FALCAI et al., 2010).

A inflamação corresponde a um mecanismo básico patológico que ocorre em várias doenças, envolvendo interações complexas entre células inflamatórias, tais como: neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos, e células vasculares, como as endoteliais e células musculares lisas. O processo inflamatório é um dos eventos mais importantes que ocorre no envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* (ALBERTINI et al., 2007).

Neste estudo, foram investigados os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio (904 nm) sobre as manifestações locais agudas caracterizadas pela formação do edema, nocicepção, influxo de leucócitos no infiltrado inflamatório muscular e mionecrose, causados pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

A presente pesquisa mostrou que o veneno induziu o edema na pata de camundongos, imediatamente após a administração do veneno, atingindo um pico máximo em 1 hora e decrescendo gradativamente até as 72 horas avaliadas. Este estudo corrobora pesquisas prévias que mostraram a capacidade do veneno botrópico em induzir a formação do edema, através da ação dos componentes do veneno sobre as células endoteliais vasculares e mediadores inflamatórios (PICOLO et al., 2002; BARBOSA et al., 2008).

No presente modelo experimental, os resultados dos animais do grupo veneno+laser (904 nm) mostraram eficácia na redução do edema de pata somente na 1ª hora após a administração do veneno, com redução em 22,76% em relação ao grupo veneno+soro. Após 6 horas, somente os animais do grupo veneno+soro+laser tiveram eficácia, com redução do edema em 10,5% quando comparado ao grupo controle (somente veneno). Após 24 horas, tanto os animais do grupo veneno+soro+laser como os do grupo veneno+soro apresentaram redução do edema em 10,4% e 9,84%, respectivamente.

Após 72 horas da administração do veneno, somente nos animais do grupo veneno+soro+laser houve redução do edema em 5,46% em relação ao grupo veneno. Dessa forma, verificou-se que na primeira hora após a administração do veneno, os animais do grupo veneno+laser mostraram eficácia na redução do edema de pata e nas demais horas os animais do grupo veneno+soro+laser tiveram

resultados estatisticamente significativos, mostrando eficácia na redução do edema de pata.

Para que o laser de baixa intensidade possa alcançar uma aplicação funcional, é necessário calibrar e aferir o equipamento pelo menos 1 vez ao ano. Fukuda et al (2010) avaliaram a calibração e aferição dos equipamentos de laser de baixa intensidade em clínicas e consultórios de fisioterapia na região da Grande São Paulo, verificando que dos 60 aparelhos analisados, apenas 8 encontravam-se dentro dos padrões das normas da ABNT. Também constataram que a dose mais empregada nas clínicas foi de 4 J/cm^2 , tendo como os efeitos mais desejados os de cicatrização e anti-inflamatório. Os autores ainda sugeriram a realização da calibração e aferição anual do aparelho.

O equipamento de laser de baixa potência de Arseneto de Gálio (904 nm) usado na presente pesquisa foi calibrado e aferido antes do início dos experimentos e a dose aplicada durante todo o experimento (4 J/cm^2) foi a mesma citada por Fukuda et al (2010).

Resultados relacionados à redução do edema mostrados por Barbosa et al. (2008) foram estatisticamente mais significantes do que os apresentados na presente pesquisa. Isso pode ter ocorrido devido o uso de um tipo diferente de gerador de laser de baixa potência, o Hélio-Neon (HeNe), com comprimento de onda de 685 nm, enquanto no presente estudo foi utilizado o laser Arseneto de Gálio (AsGa), com comprimento de onda de 904 nm.

De acordo com Agne (2005), o laser de baixa potência HeNe é mais comumente indicado para o tratamento de lesões superficiais (de pele), enquanto o laser AsGa é frequentemente indicado para o tratamento de lesões nos tendões, músculos e ossos. Isso pode determinar uma maior eficácia do laser HeNe (685 nm) na redução do edema e nocicepção, quando comparado ao laser AsGa (904 nm). No entanto, é importante que o laser AsGa seja testado para o tratamento de lesões superficiais, haja vista que não é contra-indicado para essa finalidade.

Há na literatura estudos científicos que utilizaram o laser de baixa potência AsGa no tratamento dos efeitos locais superficiais provocados pelo veneno botrópico, como o realizado por Nadur-Andrade et al. (2011) que aplicaram laser de baixa potência com três comprimentos de onda diferentes (635 nm, 685 nm e 945 nm) no edema e hemorragia induzidos pelo veneno de *Bothrops moojeni*, concluindo que o laser com as canetas de 635 nm, 685 nm e 945 nm mostraram igual eficácia

na redução do edema e hemorragia.

Nascimento e colaboradores (2010) realizaram estudos com camundongos, com o objetivo de avaliar a habilidade do veneno de *Bothrops moojeni* em induzir edema de pata, investigando os principais mediadores inflamatórios envolvidos na formação desse edema. Ao final do experimento foi observado que o veneno de *Bothrops moojeni* induziu o edema de pata mediado pela histamina, prostaglandinas e leucotrienos. Também foi verificada neutralização apenas parcial do edema local quando o soro antibotrópico foi injetado imediatamente após o veneno.

Estudos de Borato e colaboradores (2008) realizados com a indução de lesão do músculo gastrocnêmio lateral de ratos, através da injeção de formalina, avaliando-se os efeitos de três doses de laser de baixa intensidade (20 J/cm², 50 J/cm² e 100 J/cm²), com comprimento de onda de 808 nm, na dor e edema imediatos, mostraram que todas as doses de laser utilizadas não produziram redução da dor e edema nos animais, e associaram esses resultados às elevadas doses de laser que foram aplicadas.

Segundo Soares et al. (2009) o teste da formalina é usado para avaliar a atividade nociceptiva e corresponde a um modelo químico de nocicepção que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo do ácido acético, sendo considerado atualmente o teste que mais se aproxima da dor clínica.

No teste da formalina, o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção que parece envolver estímulos diferentes. A primeira fase da avaliação da atividade nociceptiva (0 a 5 minutos) corresponde à dor neurogênica ou aguda que está relacionada com a excitação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e de algumas fibras do tipo A α (alfa), associada à liberação de óxido nítrico, aminoácidos excitatórios, substância P, entre outros. Já a segunda fase (entre 20 a 30 minutos) está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a serotonina, bradicinina, prostaglandinas, entre outros.

No presente estudo foi utilizado o teste citado acima, substituindo-se a formalina pelo veneno para avaliar os efeitos do laser AsGa (904 nm) na atividade nociceptiva induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Os resultados mostraram que na primeira fase, somente os animais do grupo veneno+soro+laser mostraram redução estatisticamente significativa na resposta álgica (36,29%) quando comparado ao grupo controle (veneno). Na segunda fase, os animais dos grupos veneno+laser, e veneno+soro+laser tiveram diferença estatisticamente significativa

na redução da resposta álgica em 27,08% e 34,52%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (veneno).

Esses resultados indicaram que somente os animais do grupo veneno+soro+laser apresentaram diferença estatisticamente significativa nas duas fases da avaliação da atividade nocicetiva, mostrando que o laser, associado ao soro, reduziram a resposta álgica em camundongos. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito analgésico e biomodulador ou normalizante celular do laser de baixa potência associado com os efeitos do soro antibotrópico (DÍAZ et al., 2009; DOIN-SILVA et al., 2009).

Em estudo realizado com o extrato hidro-alcóolico da planta *Pectis jangadensis* para avaliar a atividade analgésica através dos métodos de contorções e teste da formalina, observou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com diferentes doses do extrato no que concerne ao número de contorções e ao tempo de lambertura da pata, nas duas fases (SOARES et al., 2009).

Na presente pesquisa foi realizada a administração do veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio de camundongos e após 72 horas foi feita a contagem total de leucócitos, do infiltrado inflamatório muscular, onde foi observado redução estatisticamente significativa, no número total de leucócitos, em 20,69% nos animais do grupo veneno+soro e em 22,42% nos animais do grupo veneno+soro+laser, quando comparados ao grupo controle (veneno).

Com base nestes resultados, verificou-se que o laser AsGa associado ao soro antifídico apresentou redução mais significativa no número total de leucócitos do infiltrado inflamatório muscular, ratificando a importância do uso do laser como terapia complementar ao tratamento dos efeitos locais provocados pelo veneno botrópico.

Em estudos realizados, os autores demonstraram que o laser pode modular resposta imune (SCHINDL et al., 1997). Safavi et al. (2007) relataram que o laser inibiu de forma significativa a expressão do gene de IL-1 beta e IFN-gama, no processo inflamatório. Esses autores sugeriram que o laser promoveu uma mudança na expressão de genes responsáveis pela produção das citocinas inflamatórias, diminuindo assim a quantidade de inflamação.

É provável que, na presente pesquisa, o laser tenha modulado a resposta imune, melhorando a capacidade do soro para neutralizar a inflamação no local da

administração do veneno, reduzindo assim o número total de leucócitos no infiltrado inflamatório muscular.

Resultados similares foram obtidos por Albertini et al. (2007) ao realizarem experimentos com ratos, com o objetivo de investigar os efeitos da irradiação do laser de baixa potência no edema de pata e inflamação induzidos por carragenina através de diferentes comprimentos de onda (660 nm e 684 nm) e dose de 7,5 J/cm², mostrando que ambos os comprimentos de onda da irradiação laser foram eficazes na redução da formação de edema e na migração de células inflamatórias.

Corroborando este estudo, Barbosa et al. (2008) realizaram uma pesquisa experimental com camundongos, onde analisaram os efeitos do laser de baixa potência (685 nm) na formação do edema e influxo leucocitário causados pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, com uso da dose de 4.2 J/cm². Observou-se que o laser reduziu significativamente a formação do edema e promoveu redução no acúmulo de neutrófilos, concluindo que o laser de baixa potência (685 nm) associado ao soro antiofídico pode ser considerado como uma alternativa terapêutica no tratamento dos efeitos locais causados por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*.

Zamune'ra et al. (2004) realizaram comparação dos efeitos neurotóxicos e miotóxicos de venenos botrópicos brasileiros e sua neutralização pelo antiveneno comercial, mostrando que a mionecrose foi maior com *B. jararacussu*, com 98-100% das fibras danificadas e menor com *B. jararaca*, com 74% de danos. A extensão da neutralização pelo antiveneno botrópico foi de 93% para *B. jararaca*; 65,8% para *B. erythromelas*; 30,7% para *B. moojeni* e sem neutralização para *B. jararacussu*.

Esses resultados indicam que o antiveneno não neutralizou completamente os efeitos locais provocados pelos diferentes venenos botrópicos, ratificando a importância do estudo de terapias alternativas para complementar o tratamento desses efeitos locais através do antiveneno (ZAMUNE'RA et al., 2004).

Gomes et al (2009) purificaram uma nova metaloproteinase hemorrágica do veneno de *Bothrops moojeni*, a BthMP. Essa substância apresentou atividade proteolítica e inflamatória, causando alteração na coagulação e histológica no músculo gastrocnêmio de camundongos, induzindo hemorragia, necrose e infiltrado leucocitário.

A mionecrose, no presente estudo, foi avaliada através da administração do veneno de *Bothrops moojeni* no músculo gastrocnêmio de

camundongos e após 72 horas da injeção do veneno, os animais foram sacrificados para a retirada do músculo, confecção e leitura das lâminas. Os resultados mostraram que os animais do grupo veneno+soro+laser apresentaram mionecrose segmentar em pequena dimensão (40%), inflamação leve com predominância de neutrófilos e macrófagos (80%) e regeneração expressiva, com grande hiperplasia de células satélites (40%), expondo resultados que não foram observados nos animais dos demais grupos.

De acordo com os resultados acima, observou-se através da análise histológica, que o processo de regeneração muscular expressiva, ocorreu provavelmente devido à associação da ação do soro antitoxinogênico com os efeitos benéficos do laser de baixa potência, promovendo aumento da microcirculação e do metabolismo oxidativo celular, estimulação da neoformação de vasos sanguíneos e indução da síntese de proteínas regulatórias nas células satélites do músculo esquelético (MI; CHEN; ZHOU, 2006; BORATO et al., 2008).

Dourado et al. (2003) realizaram um estudo sobre os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio no tratamento da mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*, com aplicação da dose de 4 J/cm² durante todo o experimento. Os autores avaliaram os efeitos do laser em diferentes tempos: 3, 12 e 24 horas após a administração do veneno no músculo gastrocnêmio, verificando que o laser AsGa pode ter efeito antagônico na lesão muscular provocada pelo veneno de *Bothrops moojeni*.

Estudos realizados por Doin-Silva et al. (2009) mostraram resultados semelhantes à presente pesquisa no que concerne ao efeito benéfico do laser de baixa potência na redução da mionecrose. Nesta pesquisa, o laser de baixa potência HeNe foi usado para avaliar a capacidade de prevenir a lesão do tecido muscular induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. Para isso, os pesquisadores aplicaram 3 protocolos de laser no músculo tibial de ratos: 1º com uma aplicação (3,5 J/cm²), o 2º com três aplicações (3,5 J/cm²) e o 3º com uma aplicação (10,5 J/cm²).

Os resultados mostraram que a dose de laser de 3,5 J/cm² reduziu a área de lesão muscular em 64% dos animais quando comparados ao grupo controle. O laser aplicado através do 1º protocolo foi mais efetivo do que o 2º, sendo que o 3º foi ineficaz na prevenção desses efeitos. Dessa forma, os autores concluíram que o

laser na dose de $3,5 \text{ J/cm}^2$ reduziu efetivamente a mionecrose causada pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (DOIN-SILVA et al., 2009).

Falcai et al. (2010) realizaram um estudo experimental com ratos *Wistar*, onde induziram lesão através de uma carga de 250 gramas, em músculos gastrocnêmios de ratos. Para o tratamento, usaram o laser terapêutico de baixa potência, com comprimento de onda de 960 nm, dose de 2 J/cm^2 , com duas aplicações diárias, durante 3 dias. Após a divisão dos animais em três grupos: controle; lesão muscular e lesão muscular e laserterapia, os pesquisadores compararam as médias de valores de força máxima e rigidez relativa, concluindo que a laserterapia influencia de forma positiva no processo da lesão muscular.

Sendo assim, avaliando-se os resultados do presente estudo, verificou-se que o laser de baixa potência Arseneto de Gálio (AsGa) pode ser uma alternativa terapêutica no tratamento dos acidentes ofídicos por picadas de serpentes do gênero *Bothrops*, complementando as ações do soro antiofídico, na redução dos efeitos locais agudos provocados pelo veneno.

7 CONCLUSÃO

O laser de baixa potência Arseneto de Gálio (904 nm), na dose de 4 J/cm², quando associado ao soro antiofídico, reduziu o edema de pata, nocicepção e influxo leucocitário nos animais administrados com veneno de *Bohtrops moojeni*. Em relação à mionecrose, o laser AsGa promoveu regeneração muscular expressiva quando associado à laserterapia.

Conclui-se, portanto, que o laser de baixa potência Arseneto de Gálio (AsGa) pode ser uma alternativa terapêutica para complementar a ação do soro antiofídico na neutralização das manifestações locais agudas provocadas pelo veneno botrópico.

Porém, é necessário que sejam realizados futuros estudos para a análise e comparação dos parâmetros do laser de baixa potência, como o número de sessões diárias, diferentes tipos de geradores, densidade de energia e duração do tratamento, pois há controvérsias na literatura quanto ao uso dos parâmetros adequados.

REFERÊNCIAS

- AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia: teoria e prática**. Santa Maria: Orium, 2005.
- ALBERTINI, R. et al. Effects of different protocol doses of power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 74, p. 101-107, 2004.
- ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 50-55, 2007.
- ANDRAUS, R.A.C.; BARBIERI, C.H.; MAZZER, M. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta Ortopedia Brasileira**, v.18, no. 3, São Paulo, 2010.
- BARBOSA, A.M. et al. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 1236-1244, 2008.
- BARBOSA, A.M. et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw edema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515-523, 2003.
- BATTELLINO, C. et al. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 583-593, 2003.
- BONAN, P.R.F. et al. Perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes venenosas no Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Medica Minas Gerais**, v. 20, p. 503-507, 2010.
- BORATO, E. et al. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, no. 5, set./out., 2008.
- CANABRAVA, L.C.M.N. et al. Avaliação da resposta hiperalgésica e edematogênica induzida por BmTx: uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (Caiçaca). **XII Seminário de Iniciação Científica**, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.
- CARREIRO, R.S.; COGO, J.C.; PRIANTI JÚNIOR, A.C.G.P. Estudo da miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*: análise quantitativa de fibras lesadas. **V Encontro Latino Americano de Pós-graduação-Universidade do vale do Paraíba**, 2005.

- CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**, p. 644-653, out/dez, São Paulo, 2006.
- CAVALCANTE, W.L.G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.
- DÍAZ, A.H. et al. Láser de baja potencia en el tratamiento de las calcificaciones de hombro. **Revista de la Sociedade Española Dolor**, v. 16, p. 230-238, 2009.
- DOIN-SILVA, R. et al. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 63-69, 2009.
- DOURADO, D.M. et al. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bohtrops moojeni* snake venom. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 352-357, 2003.
- ENDO, C. et al. A laserterapia de baixa intensidade acelera a regeneração de nervos periféricos. **Acta Ortopedia Brasileira**, v.16, no. 5, 2008.
- FALCAI, M.J. et al. Análise biomecânica e histológica de músculos gastrocnêmios de ratas submetidas à lesão muscular e tratados com laserterapia de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**, v. 45, no. 4, 2010.
- FERNANDES, T.A.; AGUIAR, C.N.; DAHER, E.F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, no. 2, abr.-jun., 2008.
- FONSECA, F.V., et al. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.26-29, 2004.
- FONSECA, K.C. Purificação e caracterização bioquímica da moozincina, uma metaloprotease dependente de zinco presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (caiçaca). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Uberlândia, 2010.
- FUKUDA, T.Y. et al. Aferição dos equipamentos de laser de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, p. 303-308, 2010.
- GOMES, M.S.R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 24-32, 2009.
- GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Acidentes por animais peçonhentos**. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 117-119, 2000.

HUNSKAAR, S et al. Formain test in mice, a useful technic for evaluation mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, 14: 769-785, 1985.

KING, T.C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

KISNER, C.; COLBY, L.A. **Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 2005.

KITCHEN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11^oed. São Paulo: Manole, 2003.

LIMA, A.C.S.F.; CAMPOS, C.E.C.; RIBEIRO, J.R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 329-335, mai./jun., 2009.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, p. 1012-1028, 2009.

LOUREIRO, A. A.C. Estudo experimental da ação nefrotóxica da peçonha da serpente: *Bothrops moojeni*. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2002.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: princípios e práticas**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2001.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, no. 7203, p. 428-35, 2008.

MEZADRI, T.J.; TOMÁZ, V.A.; AMARAL, V.L.L. **Animais de Laboratório: cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: Editora UFSC, 2004.

MI, X.Q.; CHEN, J.Y.; ZHOU, L.W. Effect of low power laser irradiation on disconnecting the membrane-attached hemoglobin from erythrocyte membrane. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, p. 146-150, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação de Saúde, 2001.

MORENO, E. et al. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 38, no. 1, jan./fev., 2005.

NADUR-ANDRADE, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Medicine Science**, 2011.

NASCIMENTO, M.G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-352, 2010.

NATAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 826-852, 2002.

OLIVEIRA et al. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the *Bothrops moojeni* (Caissaca). **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, p. 1069-1077, 1999.

OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Fatores associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 36, no. 6, nov.-dez., 2003.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, no. 10, oct. 2002.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista Associação Medicina Brasileira**, v. 47, n 1, jan./mar., 2001.

QUEIROZ, G.P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 30, no. 6, nov./dez., 1997.

ROCK, K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

SAFAVI, S.M. et al. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , INF- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingival. **Lasers Medicine Science**, 2007.

SANTOS-FILHO, N.A. Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida tóxica isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2009.

SANTOS-FILHO, N.A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SCHINDL, A. et al. Phototherapy with low intensity laser irradiation for a chronic radiation ulcer in a patient with lupus erythematosus and diabetes mellitus. **Brazilian Journal Dermatology**, v. 137, p.840-841, 1997.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, no. 3, p. 385-405, 2004.

da SILVA, J.O. Avaliação do efeito de extrato de *Pentaclethra macroloba* W. (Mimosaceae) sobre as atividades letal e miotóxica induzidas pelo veneno de *Bothrops atrox*. Ribeirão Preto, 100p. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2001.

da SILVA, J.O. Isolamento e Identificação de componentes antibotrópicos de *Pentaclethra macroloba* W. (Mimosaceae). Ribeirão Preto, 151p. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2005.

SILVA, N.M.V. et al. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.

SIMÕES, N.D.P. Estudo comparativo entre laser He-Ne e a estimulação elétrica no processo de cicatrização de pele em ratos. **Dissertação (Mestrado)**. 113p., Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.

SOARES, C.C. et al. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 77-81, jan./mar., 2009.

SOUSA, F.F.A. et al. Influência da irradiação do laser na regeneração nervosa em diferentes locais de tratamento. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, no. 6, 2009.

UTESCHER, C.A. *et al.* Avaliação da eficácia do antiveneno botrópico administrado no local da inoculação intramuscular do veneno de *Bothrops jararaca*: estudo experimental em camundongos. **Revista Instituto Medicina Tropical**, p. 275-278, mai/jun, 1994.

ZAMUNE'RA, S.R. et al. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259-271, 2004.

ANEXO A – Laudo de calibração do equipamento de laser



LAUDO TÉCNICO

Contratante:

ELZILIAM ARANHA DE SOUSA

Objetivo:

Calibrar os parâmetros do aparelho de modo que o mesmo fique dentro da faixa definida pelas especificações técnicas.

Instrumento utilizado para calibração:

HTM-EIME-004 - HIPOT CA Eletroteste EH510P
HTM-EIME-010 - Analisador de Seg. Elétrica Fluke DALE601E
HTM-EIME-014 - Multímetro de Bancada Minipa MDM-8045A
HTM-EIME-017 - Medidor de Potência Ótica Ophir PULSAR
HTM-EIME-023 - OSCILOSCOPIO DIGITAL TEKTRONIX 100MHZ TDS220

Nome / Número do Aparelho:

LASER HTM COMPACT / 034571

Nome / Número da Caneta LASER:

CANETA LASER HTM 904nm – 50W / 032872

Registro para Rastreabilidade:

Registro da Qualidade 09.13 034571-OS-1

Registro da Qualidade 09.15 032872-OS-1

Conclusão:

O aparelho foi submetido à calibração e seus parâmetros encontram-se dentro do especificado.

Amparo, 03 de Fevereiro de 2011.

Téc. Resp. Adriano P. de Moraes

Procedência:

Padrão sanitário do animal na procedência:

Convencional SPF Gnobiótico
 Germe Free Sem Padrão sanitário
Sexo: Macho Fêmea Idade: (semanas) Peso: (aproximado) Unidade: g
Kg

Existe planejamento estatístico? Sim Não

Qual o critério usado para definir o tamanho da amostra?

Números de animais/grupo: Nº de grupos:

Especificar os tratamentos aplicados a cada Grupo:

7.2. Condições de Manutenção

Local onde será mantido o animal:

Número de animais/gaiola:

Ambiente de contenção: gaiola baia jaula outro: _____

Tipo de cama: maravalha estrado outra: _____

Água: Filtrada sim não

Clorada sim não

Autoclavada sim não

Alimentação:

Ração ou suplementos sim não Qual:

Aditivos sim não Qual:

Forrageira sim não Qual:

Líquida sim não Qual: Água filtrada e clorada.

Sólida sim não Qual:

Dieta Específica: (especificar)

8. Procedimentos Experimentais

Jejum sim não Duração: (horas) (especificar)

Restrição hídrica sim não Duração: (horas) (especificar)

Imobilização sim não Como:

Anestesia sim não Nome Genérico: Dose: Via:

Cirurgia sim não Qual:

Recuperação pós-clínica sim não Duração:

Acompanhamento:

Analgésico sim não Nome Genérico: Dose: Via:

Justificar o não uso do analgésico:

O experimento envolve:

Dor sim não

Estresse sim não

Anorexia sim não

* Para qualquer um dos itens acima envie 1 (uma) cópia de trabalhos referentes ao assunto.

Avaliação de produção animal sim não

Pesquisa de agentes infecciosos ou parasitários sim não

Clinica e cirurgia sim não

Eficiência reprodutiva sim não

Pesquisa de enfermidades tóxicas, metabólicas, genéticas sim não

Biotecnologia sim não

Outros sim não

Resumo do procedimento experimental e justificativa da finalidade do uso de animais em caso de executar experimentos que envolvem dor, estresse ou anorexia:

Exposição a agentes químico/físico/biológico/mecânico:

Sim

Não

Qual:

Dose/Tempo:

Extração de fluídos:

Sim

Não

Qual:

Via:

Volume:

Extração de órgãos: Sim

Não

Qual(is):

Inoculação de substâncias, drogas, medicamentos ou outros: Sim Não

Qual:

Via:

Dose/frequência

9. Destino dos Animais

Re-aproveitado

Sim

Não

Como: (especificar)

Morte:

Deslocamento cervical

Perfusão sob anestesia

Exsanguinação sob anestesia

Decapitação

Aprofundamento da anestesia

CO₂

Outros (especificar)

10. Resumo do Procedimento Experimental:

11. Termo de Responsabilidade

Eu asseguro à CEEA/UNIFAP que:

11.1. Li os princípios éticos da experimentação animal elaborado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e concordo plenamente com suas exigências durante a vigência deste protocolo;

11.2. Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo;

11.3. Comprometo-me a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração ou prolongamento significativa nos experimentos aqui descritos.

11.4. Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Nome:

Data: _____

Assinatura: _____

DECISÃO DA CEEA/UNIFAP

Data da Reunião: ____/____/____

Aprovado

Aprovado com pendência

Com pendências

Reprovado

Assinatura do Coordenador: _____

ANEXO C – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo no. 006A/2011 – CEP sobre "**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LASER ARSENETO DE GÁLIO DE BAIXA POTENCIA SOBRE OS EFEITOS AGUDOS LOCAIS PRODUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops atrox***", sob a responsabilidade de **Elzilium Aranha de Sousa**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFAP, em reunião realizada em 09/03/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 006A/2011 about **AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO LASER ARSENETO DE GÁLIO DE BAIXA POTENCIA SOBRE OS EFEITOS AGUDOS LOCAIS PRODUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops atrox***, **Elzilium Aranha de Sousa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee (CEP-UNIFAP) in 09/03/2011.

Macapá, 09 de março de 2011

Prof. MSc. Alexandre Souto Santiago

Coordenador