



UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA

JÉSSIA OLIVEIRA DOS SANTOS FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO E DA FOTOBIMODULAÇÃO
NO TRATAMENTO NOS EFEITOS LOCAIS PROVOCADOS PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu***

**THE USE OF OZONE THERAPY AND PHOTOBIMODULATION THERAPY TO
TRAT LOCAL EFFECTS OF *Bothrops jararacussu* SNAKE VENOM**

**EVALUATION OF OZONIZED OIL AND PHOTOBIMODULATION IN THE
TREATMENT OF LOCAL EFFECTS CAUSED BY SNAKE VENOM *Bothrops
jararacussu***

SÃO PAULO – SP

2021

JÉSSIA OLIVEIRA DOS SANTOS FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO E DA FOTOBIMODULAÇÃO
NO TRATAMENTO NOS EFEITOS LOCAIS PROVOCADOS PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof^o Dr^o José Carlos Cogo
Orientador

Prof^o. Dr^o. Ricardo S. Navarro
Coorientador

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

F399a FERNANDES, Jéssia Oliveira dos Santos.

Avaliação do Óleo Ozonizado e da Fotobiomodulação no tratamento nos efeitos locais provocados pelo veneno da serpente *Bothrops Jararacussu* - Evaluation of Ozonized Oil and Photobiomodulation in the treatment of local effects caused by snake venom *Bothrops Jararacussu* / Jéssia Oliveira dos Santos Fernandes. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

72 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. José Carlos Cogo.

Coorientação: Prof. Dr. Ricardo S. Navarro.

1. Veneno de *Bothrops Jararacussu*. 2. Fotobiomodulação. 3. Óleo Ozonizado de Girassol. I. Cogo, José Carlos. II. Navarro, Ricardo S.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

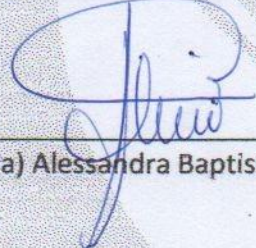
JESSIA OLIVEIRA DOS SANTOS FERNANDES

**“AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA OZONIOTERAPIA E FOTOBIMODULAÇÃO
NOS EFEITOS LOCAIS PROVOCADOS PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops
jararacussu*”.**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:


Prof(a). Dr(a) José Carlos Cogo (presidente-orientador)


Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)


Prof(a). Dr(a) Alessandra Baptista (UNIVERSIDADE BRASIL)


Prof(a). Dr(a) Huellton Wilian Kido (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)


Prof(a). Dr(a) Raduan Hage (UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA)

São Paulo, 13 de dezembro de 2021.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) José Carlos Cogo

Houve alteração do Título: sim (X) não ():

Avaliação do uso ozonizado e da fotobimodulação nos efeitos locais provocados pelo veneno da serpente Bothrops jararacussu



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA OZONIOTERAPIA E FOTOBIMODULAÇÃO NOS EFEITOS LOCAIS PROVOCADOS PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu*"

Autor(es):

Discente: **Jessia Oliveira dos Santos Fernandes**

Assinatura: Jessia Oliveira dos Santos Fernandes

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) José Carlos Cogo**

Assinatura: José Carlos Cogo

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: Dr.

Houve alteração do Título: sim (X) não ():

Avaliação do uso ozonizado e da fotobimodulação nos efeitos locais provocados pelo veneno da serpente Bothrops jararacussu.

Data: 13/12/2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e minha família: Claudio Sergio Fernandes (esposo), Leonardo Emanuel dos Santos Fernandes (filho) e Letícia Emanuela dos Santos Fernandes (filha) por me amar, iluminar, motivar, dar forças e coragem em todos os dias da minha vida. Amo imensamente vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e oportunidade de poder estudar e me qualificar para atuar melhor como profissional na área da saúde.

Ao meu esposo Claudio Sergio Fernandes por todos os momentos de apoio e compreensão de tantas ausências.

Aos filhos Leonardo Emanuel dos Santos Fernandes e Letícia Emanuela dos Santos Fernandes pela paciência e atenção nas minhas ausências, porém sempre apoiando o meu desempenho como profissional, aluna e mãe.

Meu inesquecível e eterno amigo Profº Drº Laerte Antonio da Silva (*in memoria*) sua amizade, seu amor, carinho, dedicação, cooperação, atenção, paciência, compreensão e ensinamentos ao longo desta jornada.

Aos meus pais Joselita de Oliveira Matos Santos (*in memoria*) e João Francisco dos Santos por ter concebido minha vida e dar a oportunidade de me tornar uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos Alexandre Francisco dos Santos e Josiene de Oliveira Santos Macedo Turquetti por serem pessoas boas, encantadoras e amadas por Deus.

A minha sobrinha Anaelise Oliveira dos Santos Macedo Turquetti, por me incentivar, ensinar e contribuir com sua sabedoria me auxiliando a desenvolver as pranchas, sua ajuda foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho, agradeço imensamente sua disponibilidade.

Com carinho a minha dupla Lucilene Rangel Alves, aprendemos diariamente a cuidar do próximo com amor, nos tornamos irmã de coração.

À coordenadora de enfermagem Fabiana Neman pelo apoio, incentivo e oportunidade de iniciar o doutorado.

Aos queridos professores da Especialização em Dentística Adalberto, Lucas, Marcos e Paulo pela inspiração em todos os conhecimentos transmitidos.

À Uninove em possibilitar os estudos no biotério, agradeço todos os colaboradores do biotério, as meninas da iniciação científica Amanda, Flavia, Ingrid, Luiza, Maria Luiza, Micaela, Rapaela, Sarah, Pietra em especial a Prof^a Dr^a Stella Zamuner por proporcionar a mim o aprendizado.

Agradecemos a Prof^a Dr^a Dora Ines Kozusny Andreani pela valiosa colaboração na produção do óleo de girassol ozonizado em seu laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil-Fernandópolis.

A bolsa de estudo da Universidade Brasil, ajudou-me ampliar meus conhecimentos.

O Prof^o Dr^o Daniel S. F. Magalhães contribuiu muito durante as soluções dos estudos através de tabelas e gráficos, foi fundamental para visualizar o mesmo.

O Prof^o Dr^o Ricardo S. Navarro pelas orientações e sugestões que enriqueceram o meu conhecimento.

Em especial ao meu orientador Prof^o Dr^o José Carlos Cogo pela enorme dedicação em aprimorar meus conhecimentos, sem medir esforços em cada fase dos estudos, sem o seu empenho não concluiria o estudo.

Agradeço a todos por contribuírem de forma direta e indireta no meu crescimento profissional.

EPÍGRAFE

“As dificuldades do dia a dia, os diversos ‘nãos’, as barreiras e obstáculos, me transformaram em uma profissional bem-sucedida.

Pois cresci, amadureci, desenvolvi talentos internos que me transformaram em uma pessoa forte e inspiradora.

O impossível é ‘possível’, quando acreditamos ele se torna real”

Autora: Jéssia Oliveira dos Santos Fernandes (FERNANDES, 2018).

RESUMO

O envenenamento da serpente *Bothrops jararacussu* (*jararacuçu*)(*B.jararacussu*) causa efeitos locais, como dor, inchaço, inflamação, hemorragia e mionecrose.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do óleo de girassol ozonizado (OZO) associado ou não à fotobiomodulação (FBM) nos efeitos locais promovidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. **MATERIAL E MÉTODOS:** O veneno de *Bothrops jararacussu* foi injetado no músculo gastrocnêmio direito (30 µg/50 µl NaCl 0,9%; i.m.) e os animais foram eutanasiados 3 e 24h após. O óleo foi ozonizado utilizando gerador corona (Ozone & Life® Modelo R&L1,5RM) e a FBM utilizada com os seguintes parâmetros: Thera Laser, DMC®, vermelho 685 nm, 4 J/cm², 100 mW, 0,3 cm², 1,2 J, 12 s, pontual. A FBM foi aplicada imediatamente após a inoculação do veneno e o OZO também foi aplicado imediatamente após inoculação do veneno embebido em gaze durante 15 minutos. Nos grupos controles, os animais foram injetados com solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com OZO ou FBM. Nos grupos injetados com o veneno, os animais foram tratados com OZO e FBM aplicados separadamente ou juntos. Os animais foram anestesiados, os músculos retirados, enxaguados com PBS (solução tampão fosfato), fixados em Formaldeído a 10% por 3 a 24 h, processados pelas técnicas de rotina em histologia e corados com Hematoxilina e Eosina. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz e as células contadas e mensuradas utilizando o programa de imagem J. Foram avaliadas células necrosadas e normais, realizada a análise quantitativa, morfométrica, quantificado o edema celular através da medida da área e do peso dos músculos e determinado os níveis da liberação de creatino kinase (CK). Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey-Kramer (p< 0,05). **RESULTADOS:** Os resultados mostraram que o veneno promove mionecrose das células musculares caracterizado pelo edema e ruptura das células musculares. Promove edema intracelular e liberação de CK devido a ruptura das membranas celulares. O tratamento com a FBM e OZO aplicados separadamente, protege o músculo da ação das toxinas do veneno, diminuindo o edema intracelular e diminuindo a liberação de CK. O OZO aplicado isoladamente promoveu proteção melhor do que a FBM. A associação da FBM com o OZO não promoveu efeito sinérgico nessa proteção.

CONCLUSÕES: Concluímos que devido aos efeitos benéficos verificados nesses resultados, o OZO pode se tornar um tratamento adjuvante no envenenamento

promovido pela *Bothrops jararacussu* juntamente com o antiveneno, diminuindo os efeitos lesivos locais. Essa melhora se deve aos efeitos terapêuticos do OZO.

Palavras chaves: *Bothrops jararacussu* venom. Photobiomodulation. Ozonated sunflower oil.

ABSTRACT

The poisoning of the *Bothrops jararacussu* (*jararacuçu*) snake (*B.jararacussu*) causes local effects such as pain, swelling, inflammation, hemorrhage and myonecrosis.

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the use of ozonized sunflower oil (OZO) associated or not with photobiomodulation (FBM) in the local effects promoted

by *Bothrops jararacussu* venom. **MATERIAL AND METHODS:** *Bothrops jararacussu* venom was injected into the right gastrocnemius muscle (30 µg/50 µl NaCl 0.9%; i.m.)

and the animals were euthanized 3 and 24 h later. The oil was ozonized using a corona generator (Ozone & Life® Model R&L1.5RM) and the FBM was used with the following

parameters: Thera Laser, DMC®, red 685 nm, 4 J/cm², 100 mW, 0.3 cm², 1.2 J, 12 s, spot. FBM was applied immediately after inoculation of the venom and OZO was

also applied immediately after inoculation of the venom soaked in gauze for 15 minutes. In the control groups, the animals were injected with saline solution (NaCl

0.9%) and treated with OZO or FBM. In the groups injected with the venom, the animals were treated with OZO and FBM applied separately or together. The animals were

anesthetized, the muscles removed, rinsed with PBS (phosphate buffer solution), fixed in 10% formaldehyde for 3 to 24 h, processed by routine histology techniques and

stained with Hematoxylin and Eosin. The histological sections were analyzed under a light microscope and the cells counted and measured using the J imaging program.

Necrotic and normal cells were evaluated, quantitative and morphometric analysis was performed, cellular edema was quantified by measuring the area and weight of the

muscles and determined the levels of creatine kinase (CK) release. Data were submitted to ANOVA and Tukey-Kramer tests ($p < 0.05$). **RESULTS:** The results

showed that the venom promotes myonecrosis of muscle cells characterized by edema and rupture of muscle cells. It promotes intracellular edema and CK release due to

disruption of cell membranes. Treatment with FBM and OZO, applied separately, protects the muscle from the action of venom toxins, decreasing intracellular edema

and decreasing CK release. OZO applied alone provided better protection than FBM. The association of FBM with OZO did not promote a synergistic effect in this protection.

CONCLUSIONS: We conclude that due to the beneficial effects observed in these results, OZO can become an adjuvant treatment in poisoning promoted by *Bothrops*

jararacussu together with the antivenom, reducing the local harmful effects. This improvement is due to the therapeutic effects of OZO.

Keywords: Bothrops jararacussu venom. Photobiomodulation. Ozonated sunflower oil.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Todos os anos muitas pessoas são picadas por serpentes no Brasil. As serpentes pertencentes ao grupo das jararacas são responsáveis por 97,5% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. Entre as jararacas, existe uma conhecida popularmente como a *jararacussu* que promove graves acidentes quando o veneno é inoculado na vítima. Seu veneno promove vários efeitos deletérios ao organismo entre eles, dor no local da picada, inchaço, edema e destruição das células musculares (mionecrose). O tratamento atual é o uso do soro antiofídico que é também chamado de antiveneno. O antiveneno protege o indivíduo somente a partir do momento que o indivíduo chegou no hospital e o antiveneno aplicado. Isso pode levar algum tempo, pois somente no hospital é que existe o antiveneno e a pessoa que foi picada pode demorar horas para chegar ao hospital. Por isso, a pessoa que foi picada sofre as consequências da ação do veneno e pode até levar à amputação do membro que foi picado. Neste estudo, verificamos alternativas de tratamento do acidente ofídico utilizando recursos novos para ser utilizados antes do indivíduo chegar ao hospital e iniciar a soroterapia. Assim, estudamos os efeitos do óleo de girassol ozonizado na necrose muscular promovida por esse veneno. Aplicamos o óleo ozonizado e também a fotobiomodulação logo após a simulação da picada da serpente para ver se eles protegem da ação do veneno. Verificamos que ambos os tratamentos promoveram efeito protetor frente ao veneno, porém, o óleo ozonizado de girassol sozinho mostrou-se mais eficaz nessa proteção nos tempos estudados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da espécie <i>Bothrops jararacussu</i> no Brasil	25
Figura 2: Cortes histológicos transversais dos músculos injetados com veneno de <i>B. jararacussu</i> - tempo 3 horas.....	41/42
Figura 3: Cortes histológicos transversais dos músculos injetados com veneno de <i>B. jararacussu</i> - tempo 24 horas.....	42/43
Figura 4: Quantificação de células íntegras e alteradas pelo efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i>	44
Figura 5: Mensuração da quantidade de células íntegras avaliada pela medida da área celular.....	45/46
Figura 6: Quantificação de células íntegras avaliada pela medida da área celular.....	46/47/48
Figura 7: Peso dos músculos tratados somente com OZO e somente com FBM – 3 e 24 horas.....	48/49
Figura 8: Peso dos músculos tratados somente com OZO ou com FBM – 3 horas...	50
Figura 9: Liberação de CK pelos músculos.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da FBM com laser de baixa potência.....	37
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP= Adenosina Trifosfato

COBEA= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CK= Creatinoquinase

CKMM= Creatina Quinase Músculo

EROS= Espécies Reativas de Oxigênio

FBM = Fotobiomodulação

GaAIs= Arseneto de Gálio e Alumínio

GaAs= Arseneto de Galium

GMPc= Guanosina-monofosfato cíclico

h= Hora

HE= Hematoxilina Eosina

Hz= Hertz

ic= Intracardíaca ip= Intraperitoneal

J= Jaules

Kcl= Cloreto de potássio Kg= Quilograma

LBI= Laser de Baixa Intensidade

LDH= Lactato Desidrogenase

mg= Miligrama

ms= milissegundo mV= milivolts

nm= nanômetro

OMS= Organização Mundial de Saúde

PLA₂= Fosfolipase A₂

PVC= Poli Cloreto de Vinila

TLBI= Terapia com Laser de Baixa Intensidade

WHO= World Organization

µm= Mícron

µl= Microlitro

µg= Micrograma

® = Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	222
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	Erro! Indicador não definido.2
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	244
3.2 AÇÃO DO VENENO.....	255
3.3 COAGULAÇÃO E PLAQUETAS.....	266
3.4 HEMORRAGIA.....	277
3.5 MIONECROSE E EDEMA.....	277
3.6 TERAPIA COMPLEMENTARES.....	288
3.6.1 A Terapia de fotobiomodulação no estudo de venenos de serpentes	28
3.6.2 Terapia com ozônio	30
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	344
4.2 ANIMAIS.....	344
4.3 COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.....	344
4.4 VENENO.....	344
4.5 ANESTESIA.....	355
4.6 FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	355
Para melhor compreensão dos grupos, foi feito o diagrama abaixo	Erro! Indicador não definido.5
Fonte: próprio autor.....	Erro! Indicador não definido.5
4.7 OZONIZAÇÃO DO ÓLEO.....	366
4.8 FOTOBIMODULAÇÃO.....	PARÂMETROS DA 366
4.9 APLICAÇÃO DO VENENO, DO OZO E DA FBM.....	377

4.10 PROCESSAMENTO PARA EXAME HISTOLÓGICO.....	377
4.11 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA MIONECROSE - ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	388
4.12 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA MUSCULAR ATRAVÉS DA MEDIDA DA ÁREA DAS CÉLULAS MUSCULARES.....	388
4.13 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA MUSCULAR ATRAVÉS DO PESO DOS MÚSCULOS.....	388
4.14 DETERMINAÇÃO DA ENZIMA CREATINO KINASE (CK) PLASMÁTICO.....	399
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	399
5 RESULTADOS.....	40
5.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	40
5.2 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS.....	40
5.2.1 Análise morfológica das células musculares.....	40
5.2.2 Quantificação da mionecrose.....	43
5.2.3 Quantificação do edema através da medida da área celular.....	45
5.2.4 Quantificação do edema através do peso do músculo.....	48
5.2.5 Análise bioquímica - CK.....	51
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO I.....	72

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os acidentes ofídicos apresentam um sério problema de saúde pública, devido à alta frequência que ocorrem e pela morbi-mortalidade que provocam (CARDOSO et al., 2009). Na região norte, as serpentes do gênero *Bothrops* sp são as maiores responsáveis por grande parte dos envenenamentos, que desencadeiam ações locais e sistêmicas nos indivíduos afetados. Com o envenenamento, a fisiopatologia pode apresentar-se variada, dependendo da quantidade de peçonha inoculada, localização da picada, idade, condições fisiológicas da vítima e, principalmente, do tempo que ocorreu o acidente até o atendimento médico (CARDOSO et al., 2009).

Entre as principais atividades fisiopatológicas desencadeadas pela peçonha botrópica, observa-se as ações proteolítica, coagulante e hemorrágica que causam o quadro fisiopatológico com intensa reação inflamatória no local da picada, com característica de edema, dor intensa, eritema e cianose. Com o agravamento decorrente desse efeito é possível que ocorra evolução para a mionecrose. Além dos agravantes locais ocasionados pelo acidente com serpentes do gênero *Bothrops* sp, os sinais e sintomas sistêmicos como hemorragia, coagulação, distúrbios renais e alterações cardíacas são evidentes, e se caso não forem diagnosticados e tratados no início, podem causar o óbito da vítima (CARDOSO et al., 2009).

Agrava-se o quadro clínico por envenenamento ofídico em decorrência a distâncias existentes entre os locais de ocorrência do acidente e o atendimento médico. A soroterapia com imunobiológicos (antivenenos) produzidos a partir da imunização de animais com as peçonhas das principais serpentes causadoras dos acidentes, é o tratamento preconizado para os acidentes ofídicos. Os antivenenos neutralizam, através de seus anticorpos, as toxinas responsáveis pelos efeitos sistêmicos ocasionados pelos envenenamentos por serpentes peçonhentas. Todavia, apenas o antiveneno não é capaz de neutralizar os efeitos locais produzidos pelo acidente botrópico (CARDOSO et al., 2009; BRASIL, 2011).

Observando os efeitos benéficos do OZO no organismo, foi proposto estudar a ação desse agente associado ou não a FBM no envenenamento provocado pela serpente *Bothrops jararacussu*.

Todos os anos muitas pessoas são picadas por serpentes no Brasil, promovendo vários efeitos deletérios ao organismo entre eles, dor no local da picada,

inchaço, edema e destruição das células musculares. O tratamento atual é o uso do soro antiofídico que é também chamado de antiveneno, sendo aplicado em hospital ou centros de saúde. Em muitas localidades chegar até o local de tratamento pode levar horas ocasionando maiores danos provocados pelo veneno, podendo até levar à amputação do membro que foi picado. A partir daí, surgiu a motivação principal desse estudo, estudar procedimentos terapêuticos complementares de emergência para ser utilizado pela própria vítima ou pessoas que a acompanham no momento que ocorreu o acidente ofídico. A utilização de recursos imediatos como a fotobiomodulação com laser de baixa potência e ou óleo ozonizado de girassol pode promover uma proteção inicial importante e amenizar os efeitos danosos do veneno até que o indivíduo possa chegar até o hospital para receber a soroterapia adequada.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do óleo ozonizado de girassol (OZO) associado ou não à fotobiomodulação (FBM) nos efeitos locais promovidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar observações clínicas e comportamentais dos animais injetados com o veneno e tratados com OZO e FBM.
- Verificar histologicamente os efeitos do veneno promovendo a mionecrose e os efeitos dos tratamentos
- Avaliar o índice de mionecrose nos músculos tratados
- Verificar o edema promovido nesse processo através da técnica de pesagem do músculo e pela mensuração da área das células musculares
- Verificar a liberação de creatino kinase (CK) pelas células musculares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil são registrados cerca de 30.000 acidentes ofídicos por ano, no qual estima-se 15 casos por 100.000 habitantes, no qual 100 (0,4%) morrem de ofidismo a cada ano. Cerca de 90% dos acidentes são ocorridos por representantes das diversas espécies do gênero *Bothrops* (CHIPAUX, 1998; CHIPAUX, 2009; CHIPAUX, 2012; GUTIÉRREZ et al., 2006; WHO, 2010, 2019).

Em especial na região sudeste e em São Paulo, as serpentes do gênero *Bothrops sp* são consideradas responsáveis por aproximadamente 80% dos acidentes ofídicos (COGO et al., 2006; OLIVEIRA e COGO, 2015; WHO, 2019).

Os acidentes ocasionados por serpentes tornam-se um problema de Saúde Pública nas regiões tropicais de todo o mundo. Há uma elevada incidência de número de mortes por picada de serpentes por falta de recursos no tratamento e notificação (COGO et al., 2006; MONACO et al., 2017).

Apesar do avanço tecnológico da evolução na área da saúde, a problemática atual ainda é a subnotificação, principalmente nas zonas rurais, apesar que a zona urbana também tem elevados índices.

As serpentes *Bothrops* estão envolvidas nestes acidentes, apresentam desde gravidade de grau leve em 62,0% a grave em 28,0% dos casos notificados e a região do corpo mais atingida são os membros inferiores (BRASIL, 2011; OLIVEIRA e COGO, 2015; ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019).

Um importante dado relacionado a notificação do ofidismo são os registros que aumentam a cada ano que passa, o que levou a Organização Mundial da Saúde considerar o ofidismo uma doença tropical negligenciada pelos governos ocorrendo principalmente com populações pobres que vivem em áreas rurais (OLIVEIRA e COGO, 2015; MONACO et al., 2017).

Em agosto de 2010, o agravo foi incluído na Lista de Notificação de Compulsória (LNC) do Brasil, publicada na Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010 (ratificada na Portaria Nº 104, de 25 de janeiro de 2011). O fato dessa importância foi por motivo do alto número de notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), que são acidentes por animais peçonhentos (OLIVEIRA e COGO, 2015; ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019).

Com as análises dos dados do SINAN, a vigilância epidemiológica consegue identificar a quantidade de antivenenos que podem ser distribuídos nas Unidades

Federadas, além de determinar locais estratégicos de atuação da vigilância sanitária, favorecer estruturas nas unidades de atendimento aos acidentados, colaborar nas estratégias de controle aos animais peçonhentos (OLIVEIRA e COGO, 2015; COGO et al., 2006; GUTIÉRREZ et al., 2006; GUTIÉRREZ et al., 2007).

Os acidentes ofídicos são classificados como: leves, moderados ou graves. Nesta classificação temos como base as manifestações locais e sistêmicas e, ambas auxiliando na dose adequada do antiveneno a ser utilizado. Após a picada se for administrado a dose do antiveneno adequada, os efeitos sistêmicos dos venenos podem ser atenuados. Com isso, os coeficientes de letalidade têm revelado tendências decrescentes ao longo do tempo. Porém, a neutralização dos efeitos locais não é revertida (BRASIL, 2011; PICOLO et al., 2002; ZAMUNER et al., 2004).

3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A Família *Viperidae* é constituída pelo gênero *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucu). São consideradas serpentes peçonhentas, podendo serem encontradas nas Américas Central e do Sul, consideradas principais causadoras de acidentes ofídicos no Brasil e em outros países por onde se distribuem, com altas taxas de morbidade e mortalidade (BRASIL, 2011).

As diferentes espécies exibem extensa variabilidade, especialmente nos padrões de coloração e comprimento (BRASIL, 2011).

Na língua indígena a serpente *B. jararacussu* é conhecida como “jararaca grande”. Pertence à classe *Reptilla*, ordem *Squamata*, família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae* e com nome científico de *B. jararacussu*. As diferenças das jararacas são pelas características do desenho em seu corpo e ter a parte superior da cabeça negra, de um modo em geral é facilmente reconhecida sendo que as fêmeas tem grande porte em relação aos machos. Na fase adulta pode atingir entre 1,5 a 2,20 m e com 22 cm de circunferência. Há um acentuado dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, as características são das fêmeas serem de cor amarelas e pretas, enquanto os machos têm tons marrons e pretos, além de serem menores e mais delgados e quando se sentem ameaçadas são extremamente agressivas (CARDOSO et al., 2009; BRASIL, 2011; ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019).

Estas serpentes apresentam hábito noturno ou crepusculares. Geralmente são

ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019).

As reações locais imediatas ocorrem com 24 horas e são: dor, sangramento no local da picada (hemorragia), edema intenso que pode evoluir por todo o membro afetado, hematoma, equimose, abscesso, trombose, formação de bolhas e mionecrose (CARDOSO et al., 2009; ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019; TEIXEIRA et al., 2003).

As complicações se manifestam na forma grave com hemorragia em regiões vitais, infecção e necrose na região da picada, além de insuficiência renal, hemorragia cardíaca, pulmonar e evolução ao choque e óbito (TREBIEN e CALIXTO, 1989; ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002).

Os venenos botrópicos provocam a liberação de mediadores inflamatórios, ativam o mecanismos intracelulares, induzindo a liberação de substâncias (OLIVEIRA e COGO, 2015; ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002; ZAMUNER et al., 2005).

As alterações sistêmicas consistem em hipotensão, alteração da coagulação sanguínea, hemorragias (gingivorragia, hematúria, sangramento em ferimentos recentes), hemorragia pulmonar causada pela ação secundária podendo ser a causa provável de morte rápida, alteração do sistema cardiovascular evoluindo para ocasionar o choque hipovolêmico e risco de insuficiência renal aguda (CARDOSO, 2009; ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019; ZAMUNER et al., 2001; BERNARDE, 2009).

O processo fisiopatológico do veneno botrópico consiste em 3 atividades:

- Proteolítica (inflamação aguda);
- Coagulante;
- Hemorrágica.

Essas atividades são complexas podemos atribuir isso aos componentes específicos, pois diferentes toxinas podem atenuar sinergeticamente induzindo efeitos e reações tóxicas adversas (ZAMUNER et al., 2001; BERNARDE, 2009).

3.3 COAGULAÇÃO E PLAQUETAS

O veneno brotrópico possui capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo frequentemente incoagulabilidade sanguínea. A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui, isolada ou simultaneamente, substâncias capazes de ativar

fibrinogênio, protrombina e fator X. São descritos fatores com atividade sobre agregação e aglutinação plaquetária. Trombocitopenia pode ocorrer nas primeiras horas e, eventualmente, persistir por dias (OLIVEIRA e COGO, 2015; MILANI-JUNIOR et al., 1997).

3.4 HEMORRAGIA

A hemorragia provocada pelo envenenamento bothrópico decorre do rompimento da integridade do endotélio vascular e têm atividade como protagonista as desintegrinas encontradas no veneno. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como: o colágeno tipo 4, fibronectina e laminina. Além disso, são potentes inibidoras da agregação plaquetária. Tem como possíveis mecanismos de ação na digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e a ruptura completa das células endoteliais e desencadeariam mecanismos endógenos (ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS, 2019; ZAMUNER et al., 2001; BERNARDE, 2009).

Nas manifestações sistêmicas ocorrem alterações da homeostasia caracterizada pela deficiência de coagulação sanguínea, da agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio. O veneno bothrópico atua ativando a cascata de coagulação sanguínea, por atuarem sobre o fibrinogênio, a protrombina (Fator II), no fator X e no Fator VIII, provocando o consumo nos fatores de coagulação (ZAMUNER, 2001; BERNARDE, 2009; MILANI-JUNIOR et al., 1997).

A cascata de coagulação ativada determina ausência de coagulação sanguínea, caracterizando sangramentos espontâneos (hemorragias). Nas alterações do sistema cardiovascular, ocorre o choque hipovolêmico, em casos mais graves acontece a insuficiência renal aguda, hemorragia em órgãos vitais, estado de choque e óbito (KOUYOUMDJAIN et al., 1991).

3.5 MIONECROSE E EDEMA

Nos envenenamentos provocados pelas serpentes do gênero *Bothrops* tem como consequência muito comum a mionecrose local. Esse fenômeno é ocasionado por uma família de proteínas denominadas miotoxinas, que tem características de

fosfolipases A₂ (PLA₂) e agem diretamente sobre a membrana da célula muscular, ligando e alterando a estrutura da membrana plasmática. Essas miotoxinas estimulam o dano tecidual de modo que, as modificações morfológicas são observadas já a partir de 15 minutos de sua inoculação. A miotoxicidade ainda pode ser, o fator determinante da isquemia dos vasos da microcirculação e de artérias intramusculares (COGO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2003; MILANI-JUNIOR et al., 1997).

Algumas pesquisas descrevem também que várias espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, como a *Bothrops alternatus* e *Bothrops asper* induzem a mionecrose, procedente de uma ação direta das miotoxinas que atingem a integridade da membrana plasmática das células musculares (OLIVEIRA e COGO, 2015; BERNARDE, 2009).

Em relação a atuação do leucócitos induzido pelo envenenamento botrópico, observa-se que após a administração do veneno de *B. jararacussu* ocorre a migração de leucócitos na cavidade peritoneal de ratos, o infiltrado leucocitário fica composto com os neutrófilos e estimula a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF- α), os mediadores lipídicos prostaglandina E₂ (PGE₂), o tromboxano A₂ (TXA₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (TREBIEN e CALIXTO, 1989; ZAMUNER e TEIXEIRA, 2002; ZAMUNER et al., 2005; BERNARDE, 2009; OLIVO et al., 2007).

O edema induzido pelos venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops asper* e *Bothrops insularis* ocorre devido a ação dos mediadores e adrenérgicos, eicosanóides, o fator ativador de plaquetas (PAF), além de serotonina e histamina (BERNARDE, 2009; OLIVO et al., 2007).

Após o efeito edematogênico, há o acúmulo de leucócitos no músculo gastrocnêmio sendo o infiltrado leucocitário composto de neutrófilos, monócito além do aumento de citocinas inflamatórias, como a IL-1, IL-6, IL-10, TNF e IFN, também observa-se a liberação de PGE₂ e PGD₂, por causa do aumento da expressão de COX-2 (ZAMUNER et al., 2017; OLIVO et al., 2007).

3.6. TERAPIAS COMPLEMENTARES

3.6.1 A terapia de fotobiomodulação no estudo de venenos de serpentes

A terapia com fotobiomodulação acontece devido à sua interação com os tecidos, promovendo efeitos fotoquímicos. A fotobiomodulação com laser de baixa potência proporciona a produção de ácido araquidônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, revelando sua ação antiedematosa e antiinflamatória, favorece o aumento da endorfina circulante (beta endorfina) promovendo o efeito analgésico na dor não inflamatória (NADUR-ANDRADE et al., 2012; GIARETTA et al., 2016; BARBOSA et al., 2009).

Estudo sobre fotobiomodulação com laser de baixa potência ocorre desde a década de 60 em diversos campos da medicina. A radiação eletromagnética na região do vermelho ($\lambda 620-750\text{nm}$) pode ser utilizada promovendo o aumento da atividade muscular. A fotobiomodulação com laser de baixa potência proporciona alterações na atividade do citocromo C oxidase promove o aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), a fonte principal de energia celular, na qual conduz a função celular à sua normalização, estimula o aumento da concentração de ATP após a fotobiomodulação com laser de baixa potência melhorano o transporte de membrana, a síntese proteica e a contração muscular (NADUR-ANDRADE et al., 2013; BARBOSA et al., 2009; GUIMARAES-SOUZA et al., 2011; GARCEZ et al., 2012).

Na literatura científica há diversas publicações sobre o uso da fotobiomodulação com laser de baixa potência no envenenamento ofídico utilizando experimentos com animais de laboratório, estudando o mecanismo de ação com proposito de futura viabilidade para uso clínico em humanos (GARCEZ, 2012; BARBOSA et al., 2008; BULGARELLI et al., 2010; CAMPOS et. al., 2018).

Assim, foram estudado o efeito da irradiação laser de Ga-As (4 J/cm^2), em mionecrose no músculo gastrocnêmio de camundongo causado pela injeção intramuscular de veneno serpente *Bothrops moojeni* e nas contraturas tetânicas do músculo tibial anterior de camundongos inoculados com peçonha de *Bothrops jararaca*. Os autores observaram que o laser foi capaz de reduzir o índice de mionecrose, inibindo a atividade do veneno e reduzindo o processo inflamatório local causado pelo envenenamento, ou seja, observaram proteção dos efeitos locais provocado pelo veneno (DOURADO et al., 2003).

Em relação ao efeito fotobiomodulador, o mesmo resulta da condição metabólica do tecido ao ser irradiado, isto é, se há alguma alteração tecidual. O resultado baseado no potencial redox pode ser benéfico, com o mecanismo químico

modificado através do potencial redox da cadeia respiratória mitocondrial (citocromo C oxidase e NADH desidrogenase).

Por outro lado, os fotorreceptores regulam o metabolismo na cadeia respiratória, onde as mitocôndrias e seus receptores absorvem a luz no intervalo espectral do visível ao infravermelho próximo. Isso acontece com a célula no estado redox intermediária, influencia a transferência de elétrons fornecendo uma resposta biológica (GIARETTA et al., 2016; BARBOSA et al., 2009; 2010; TUNER e HODE, 2004).

Os diversos efeitos terapêuticos da fotobiomodulação sobre os diferentes tecidos biológicos são bastante abundantes e promissores causando efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos e o aumento da microcirculação local. O efeito bioenergético está relacionado a este aumento onde, a ação da luz laser no esfíncter pré-capilar através de mediadores químicos, mantém o mesmo aberto continuamente promovendo a microcirculação periférica local (GIARETTA et al., 2016; BARBOSA et al., 2009; 2010; SOUZA et al., 2010; VIEIRA et al., 2016; SOUSA et al., 2012).

A terapia de fotobiomodulação é uma modalidade não invasiva e de baixo custo que na prática clínica vem sendo amplamente utilizada devido promover o alívio de dor e regeneração tecidual. A fotobiomodulação é estudada várias áreas da saúde para analisar seu efeito e o melhor parâmetro para ser utilizado nos processos de algias, fadiga muscular, redução de lesões musculoesqueléticas provenientes do excesso de atividades físicas, no controle ou eliminação do lactato, modulação dos níveis séricos de CKMM, LDH, e EROs, na melhora do efeito da mitocôndria durante os exercícios e aumento na microcirculação (GIARETTA et al., 2016; BARBOSA, 2009; GUIMARAES-SOUZA et al., 2011; BARBOSA et al., 2008).

3.6.2 Terapia com ozônio

O químico alemão Christian Friedrich Schonbein é considerado o pai da ozônioterapia (1840). Ele realizou uma descarga elétrica na água a qual produziu um odor estranho, e por isso o chamou de Ozon, que deriva do Grego *ozein* (cheiro). O cirurgião austríaco Ernst Payr, após ser tratado com ozônio por Edward Fisch, o primeiro dentista a utilizar o ozônio, tornou-se um entusiasta a começou sua linha de pesquisa. Na época, a ozônioterapia era difícil e limitada devido à falta de materiais

ozônio resistentes, tais como Nylon, Dacron e Teflon. Apenas em 1950, os materiais ozônio resistentes foram fabricados. Então o físico, doutor e alemão Joachim Hansler, juntou-se a outro alemão, doutor em medicina, Hans Wolff e ambos desenvolveram o primeiro gerador para fins médicos, o qual permanece sendo a base dos equipamentos contemporâneos (NOGALES, 2011; SEIDLER et al., 2008).

O ozônio é um composto químico de três átomos de oxigênio (O_3), altamente energético em relação ao oxigênio (O_2) atmosférico. Assim, as moléculas destes dois compostos são diferentes na estrutura (ABOZ, 2021).

A característica do ozônio é a oxigenação tecidual e melhora no metabolismo, por apresentar uma ação positiva em doenças infecciosas agudas e crônicas causadas por vírus, bactérias e fungos, em queimaduras, úlceras diabéticas, além de outras (SCROLLAVEZZA et al., 2002; HERNÁNDEZ e GONZÁLEZ, 2001).

O ozônio interfere no metabolismo de bactérias, inibindo e bloqueando o funcionamento enzimático; uma pequena quantidade de ozônio é suficiente para romper a membrana celular, levando à sua destruição. Pressupõe-se que o ataque primário do ozônio aconteça na parede celular das bactérias e, depois, quando penetra no interior da célula, este agente promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos, ocorrendo a lise celular (HERNÁNDEZ e GONZÁLEZ, 2001; CARDOSO et al., 2008).

O ozônio medicinal é sempre uma mistura de ozônio e de oxigênio puro, produzido por um gerador de ozônio (promove uma descarga elétrica entre 13.000 e 15.000 volts nas moléculas de oxigênio, o que possibilita a agregação dos átomos e a formação do gás ozônio). A dose utilizada no campo da medicina varia entre 1 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,05 a 5% de ozônio) para cada litro de oxigênio de acordo com a via de administração e a doença; sua meia-vida é de aproximadamente 40 minutos a 20° C (GURLEY, 1985; OGUZ et al., 2011).

As propriedades biológicas foram atribuídas ao ozônio com base nos estudos que fundamentaram seu uso terapêutico. Devido à sua capacidade de modular o estresse oxidativo biológico. Seu efeito antimicrobiano exibe propriedade bactericida contra gram + e gram - ; fungicida e viricida, bloqueando receptores virais, destruindo células infestadas por estes microorganismos. Além da capacidade de eliminar protozoários, mostrando desta forma seu efeito tanto desinfetante como esterilizante (AZARPAZHOOH, 2008; RIPAMONTI et al., 2012; NUÑEZ et al., 2013).

O ozônio em aplicação local exibe propriedades antiálgicas e anti-inflamatórias. Neutraliza mediadores neuroquímicos da sensação dolorosa, facilitando a metabolização e eliminação de mediadores inflamatórios como histamina, quinina e bradicinina. Por isso é utilizado como coadjuvante no tratamento de algumas dores crônicas. Também inibe a cicloxigenase II evidenciando a redução da hiperpermeabilidade, edema e dor (AZARPAZHOOH, 2008; KIM, 2009; NOGALES, 2011).

O ozônio se mostra imuno-estimulante em baixas doses e imuno-inibidor a níveis mais elevados. Este gás é capaz de estimular as defesas imunológicas, tanto celulares como humorais, em pacientes imunodeprimidos, ou de modular as respostas imunológicas exacerbadas que produzem as enfermidades autoimunes (OGUZ et al., 2011; NOGALES, 2011).

É também capaz de melhorar o metabolismo do oxigênio, estimulando as enzimas que participam de sua metabolização. Assim sendo, a saturação de oxigênio no sangue circulante é elevada, aumenta-se o aporte de oxigênio das células do organismo, melhorando a oxigenação e respiração celular. Facilitando a circulação sanguínea devido às melhoras das propriedades sorológicas do sangue.

Portanto, no ozônio medicinal há propriedades altamente bactericidas, fungicidas e virustático. Utilizado para desinfecção de feridas infectadas, assim como em doenças bacterianas e virais.

A sua capacidade de estimular a circulação é usada no tratamento de problemas circulatórios e na revitalização de funções orgânicas em geral. Isto significa que a aplicação do ozônio medicinal é útil para a ativação imunológica em pacientes com condições de imunidade baixa e/ou imunodeficientes (ABOZ, 2021).

O ozônio médico é indicado para:

- Tratamento de problemas circulatórios e na área da geriatria;
- Tratamento das doenças provocadas por vírus, tais como hepatites e herpes;
- Tratamento de feridas infectadas, inflamadas, mal curadas e de processos inflamatórios crônicos, tais como úlceras nas pernas, colites e outras inflamações intestinais, além de queimaduras;

Como terapia complementar em vários tipos de câncer, o ozônio é aplicado para a imunoativação geral, em dosagens baixas, na forma de “Auto-hemoterapia Maior” (ou Grande Auto-hemoterapia, GAHT) na qual o sangue é reinfundido por via

endovenosa, ou de “Auto-hemoterapia Menor” (ou Pequena Auto-hemoterapia, PAHT), na qual o sangue ozonizado é injetado via intramuscular (ABOZ, 2021).

A Ozônioterapia, atualmente, é reconhecida pelo Ministério da Saúde da Alemanha, da Suíça, da Espanha, do Egito, países da Ásia, Cuba e de outros 15 países, além de ser praticada em 13 estados dos Estados Unidos da América. A terapia está sendo utilizada como tratamento alternativo eficiente e de baixo custo.

A maioria das enfermidades tem uma resposta positiva ao aumento da oxigenação tecidual, eleva o O₂ na circulação sanguínea, estimulando a neoangiogênese (ABOZ, 2021; OGUZ et al., 2011; AZARPAZHOOH, 2008).

A ozônioterapia é a administração terapêutica de ozônio nos tratamentos de lesões complexas, infecções fúngicas, bacterianas e virais, lesões isquêmicas e várias outras afecções, mostra-se eficiente na maioria dos casos, principalmente na atuação na desinfecção e cicatrização de feridas extensas (RIPAMONT et al., 2012; KIM, 2009).

O ozônio é uma alternativa de baixo custo, confiável, com poucos efeitos colaterais no tratamento de feridas, porém deve-se obedecer a concentração, dose e tempo específico, ressalta-se também a sua aplicação como antisséptico em cirurgias, irrigação de feridas cirúrgicas na hemostasia transoperatória, contribuindo com o processo de reparo através do estímulo à vascularização e maior oxigenação local (OGUZ et al., 2011; KIM, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Lab. da Universidade Nove de Julho – UNINOVE – Campus Vergueiro – São Paulo – SP.

4.2 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas (18-22 g) foram obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Nove de Julho (UNINOVE, Campus Vergueiro, São Paulo, SP, Brasil) e foram alojados a aproximadamente 24°C em gaiolas de polipropileno (41 × 34 × 17 cm; 5-10 animais/gaiola) em ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 6h). As gaiolas foram limpas 2-3 vezes / semana, e os animais tiveram acesso a ração para roedores e água *ad libitum*.

4.3 COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA, protocolo no. 6426070319) da UNINOVE. Os experimentos foram feitos de acordo com as diretrizes éticas para o uso de animais estabelecidas pela legislação da Sociedade de Zootecnia de Laboratório (SBCAL) e legislação brasileira (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), em conjunto com as diretrizes para experimentos com animais estabelecido pelo Conselho Nacional Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 VENENO

O veneno de *B. jararacussu* foi gentilmente cedido pela Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP – São José dos Campos – São Paulo – SP – Brasil. O veneno foi extraído manualmente e em seguida mantidos em gelo. Após foram liofilizados, armazenados em frascos apropriados e mantidos em geladeira a 4°C até a hora do seu uso.

4.5 ANESTESIA

Durante a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com Xilazina (10 mg/kg, i.p.) e ketamina (100 mg/kg, i.p.) (LABTEST, São Paulo, SP, Brazil). Após, foram inoculados com veneno de *B. jararacussu* (30 µg dissolvidos em 50 µL em solução salina 0.9% NaCl; correspondendo a 1,5 mg/Kg). Para a eutanásia foi usado overdose dessas drogas, de acordo com o proposto no formulário do Comitê de Ética.

4.6 FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados 66 camundongos escolhidos aleatoriamente para formar os grupos e foram avaliados 3 e 24 horas após a inoculação do veneno. O veneno foi inoculado no músculo gastrocnêmio direito (via i.m.).

Os seguintes grupos foram formados:

GRUPO 1 controle – animais (n=3 - 3hs, n=3 - 24hs) injetados (i.m.) com 50 µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%).

GRUPO 2 - animais (n=5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados (i.m.) com 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com OZO.

GRUPO 3 – animais (n=5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados (i.m.) com 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com FBM.

GRUPO 4 – animais (n=5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados com 30 µg de veneno de *B. jararacussu* (i.m.) em 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%).

GRUPO 5 – animais (n= 5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados com 30 µg de veneno de *B. jararacussu* (i.m.) em 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com OZO.

GRUPO 6 – animais (n=5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados com 30 µg de veneno de *B. jararacussu* (i.m.) em 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com FBM.

GRUPO 7 – animais (n=5 - 3hs, n=5 - 24hs) injetados com 30 µg de veneno de *B. jararacussu* (i.m.) em 50 µl de solução salina (NaCl 0,9%) e tratados com óleo OZO+FBM.

4.7 OZONIZAÇÃO DO ÓLEO

O óleo de girassol foi ozonizado (1 L de óleo de girassol, fluxo 2 L/min, concentração de oxigênio/gás ozono de 30 mg/L para 6 h) usando um gerador de ozono corona (Ozone & Life®, Modelo R&L 1.5 RM, Brasil) que gerou óleo ozonizado com 87,3 mEq/kg de peróxido (equivalente a 350 mg/L) (GUERRA et al., 1997; SECHI et al., 2001; SANCHEZ et al., 2012).

O gás de oxigênio puro foi fornecido por um cilindro de oxigênio (White Martins, Brasil) que foi utilizado para a produção constante de ozônio, transportado através de um tubo de silicone para um difusor poroso. O óleo ozonizado levou cerca de 1 h a 2 dias para chegar à concentração necessária de peróxidos à temperatura ambiente, com 1 g de óleo que, absorve até 160 mg de gás de ozono (BOCCI et al., 2009).

Quando armazenado corretamente (longe da luz e em temperaturas baixas ou médias), o óleo ozonado tem um prazo de validade de até 1 ano sob refrigeração (de -10 a 8 °C) ou 6 meses a ~ 25 °C, para manter um pH estável durante estes períodos (SECHI et al., 2001; NOGALES et al., 2008).

No presente estudo, o OZO foi armazenado em 5°C até a hora do uso (SADOWSKA et al., 2008; BOCCI et al. 2009).

4.8 PARÂMETROS DA FOTOBIMODULAÇÃO

O dispositivo laser utilizado foi Laser da marca DMC® modelo Thera Laser, Meio ativo InGaAlP e AsGaAl. Os parâmetros utilizados estão na Tabela1.

Tabela 1 - Parâmetros da FBM com laser de baixa potência.

<i>Parâmetros</i>	<i>Laser Vermelho</i>
Comprimento de onda (nm)	685
Densidade de energia (J/cm ²)	4
Energia total (J)	1.2
Potência (mW)	100
Densidade de Potência (W/cm ²)	0,25
Área irradiada (cm ²)	0,3
Área do feixe (cm ²)	0,028
Modo de aplicação	Pontual
Número de pontos	1
Tempo de irradiação (s)	12

4.9 APLICAÇÃO DO VENENO, DO OZO E DA FBM

Após anestesia, os animais foram injetados com o veneno e em seguida no local da injeção foi aplicada gaze embebida com o OZO durante 15 minutos e/ou FBM com laser de baixa potência. Em seguida os animais foram colocados em caixas apropriadas e observados os sinais e sintomas.

4.10 PROCESSAMENTO PARA EXAME HISTOLÓGICO

Para avaliar o índice de mionecrose induzido pelo veneno, foi utilizado o exame histológico do tecido muscular. Após os tempos determinados nos grupos, os animais foram anestesiados e sob anestesia, os músculos foram cuidadosamente retirados para processamento histológico. Os músculos foram enxaguados com PBS (solução tampão fosfato), fixados em Formaldeído a 10% por 3 a 24h horas. Após, foram

submetidos ao processamento histológico utilizando técnicas de rotina, montadas as lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.).

4.11 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA MIONECROSE - ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise das células integras e com mionecrose foi realizada nas lâminas coradas com H.E. Foi utilizado microscópio Nikon Eclipse E200 para a obtenção de fotomicrografias e análise das imagens, respectivamente. Foram selecionados 5 campos pré-determinados da região da lesão de cada lâmina.

As células musculares foram analisadas qualitativamente verificando a integridade da membrana celular, posição dos núcleos, diâmetro e área das fibras. Foram contadas aproximadamente 100 células de cada grupo experimental observando a relação entre células necrosadas e células normais.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA MUSCULAR ATRAVÉS DA MEDIDA DA ÁREA DAS CÉLULAS MUSCULARES

Observando as células musculares nas lâminas histológicas, verificamos que haviam células com tamanho maiores que as células normais e resolvemos mensurar a área das mesmas para verificar a formação do edema. As lâminas com os cortes processados 3 e 24 horas após os tratamentos foram analisados utilizando o software IMAGE J. Foram mensuradas áreas de 500 células observadas em diferentes campos do corte na região injetada o veneno.

4.13 QUANTIFICAÇÃO DO EDEMA MUSCULAR ATRAVÉS DO PESO DOS MÚSCULOS

Para determinar o edema muscular, o veneno de *B. jararacussu* foi injetado no músculo gastrocnêmio direito de camundongos.

Os músculos foram dissecados e cuidadosamente retirado e pesado. O edema foi mensurado no tecido muscular pela quantificação do peso molhado 3 e 24 horas após a injeção do veneno. Foi expresso como porcentagem do aumento no peso dos

músculos nos diversos tratamentos como descrito na literatura (OLIVEIRA e COGO, 2015).

4.14 DETERMINAÇÃO DA ENZIMA CREATINO KINASE (CK) PLASMÁTICO

Foram colhidas amostras de sangue 3 h e 24 h após a inoculação da solução salina ou injeção de veneno e centrifugado. O plasma resultante foi separado e armazenado a 4 °C para determinação da atividade da enzima creatina kinase (CK) utilizando kits de diagnóstico disponíveis comercialmente (LABTEST).

A atividade de CK foi expressa em U/L, onde uma unidade sendo definida como a quantidade de enzima que produz 1 mmol de NADH/min, de acordo com o fabricante especificações.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (SE). Antes da análise estatística, a normalidade dos dados para cada grupo foi avaliado utilizando o teste Shapiro-Wilk. Todos os dados analisados passaram no teste Shapiro-Wilk; por conseguinte, os dados paramétricos foram comparados utilizando a ANOVA de uma via seguida pelo teste de pos-hoc de Tukey. Consideramos significativas as diferenças com $p < 0,05$. Todas as análises de dados foram feitas usando Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Durante a execução dos experimentos, foram realizadas observações clínicas e comportamentais dos animais. No grupo controle, foi observado que os animais estavam com comportamento normal, ou seja, caminhavam pela caixa, comiam e bebiam normalmente. Nas primeiras 3 horas, o grupo que foi inoculado com o veneno ficou prostrado no canto da caixa, sem interesse em comer ou beber. No grupo que foi aplicado a FBM, os animais não apresentaram comportamento como no grupo inoculado somente com o veneno. Movimentavam-se pela caixa e mantinham o interesse em comer e beber. Essa melhora no comportamento foi observada também com o grupo que recebeu somente OZO e OZO+FBM, porém com maior intensidade do que o grupo inoculado somente com óleo ozonizado. Após 24 horas, os animais do grupo inoculado com veneno apresentavam hemorragia intensa, continuavam prostrados e com dificuldades para caminhar. Por sua vez, os animais que foram tratados com FBM mostraram melhora no comportamento em relação ao tempo de 3 horas. Os tratados com o OZO estavam melhores, mais calmos, caminhando pela caixa, comendo e bebendo normalmente e movimentando melhor do que o grupo com apenas FBM.

5.2 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS

5.2.1 Análise morfológica das células musculares

No grupo controle e nos grupos onde foram aplicados a FBM e o OZO, as células musculares mostraram-se normais, com núcleos periféricos, membranas celulares intactas, vasos sanguíneos íntegros e espaços intercelulares sem hemorragia.

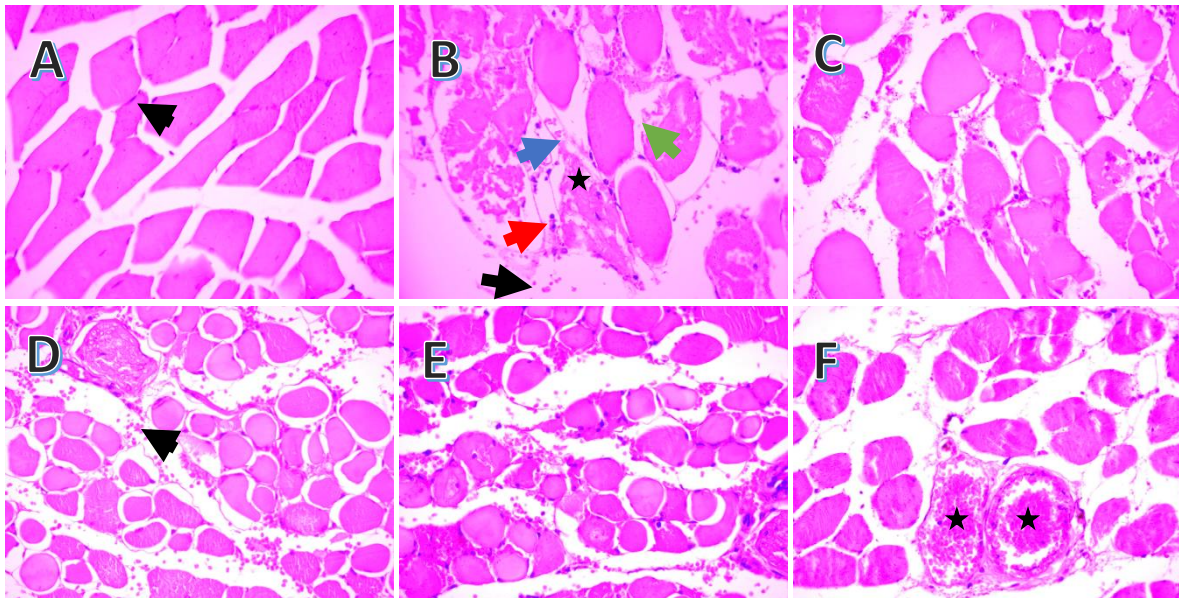
O veneno de *B.jararacussu* promoveu alterações nas células musculares. Os componentes do veneno degradaram as membranas das células musculares 3 horas após a inoculação do veneno. As células estavam com as membranas rompidas, com edema e hemorragia, diferentemente quando comparadas com as células dos músculos controle (Figura 4A e B).

No grupo onde foi aplicado a FBM, o número de células que sofreram ação do veneno foi menor, mostrando que esse tratamento teve uma ação protetora contra os efeitos do veneno (Figura 4C).

O tratamento somente com o OZO também mostrou-se eficaz em proteger as células musculares. O número de células necróticas foi drasticamente reduzidas (Figura 4D e E).

Os músculos tratados com OZO e FBM mostraram-se muito semelhantes aos do grupo controle. As alterações apareceram com menor número e intensidade embora o efeito hemorrágico tenha persistido (Figura 4F).

Figura 2: Cortes histológicos transversais dos músculos injetados com veneno de *B. jararcussu* - tempo 3 horas: A – Controle: observa-se que as células estão com a morfologia normal, membrana celular intacta, núcleos periféricos (seta), diâmetros normais das células, sem infiltrado inflamatório, espaços intercelulares regulares. B – músculo injetado com veneno: nota-se rompimento da membrana celular (seta verde), degradação da célula caracterizando a mionecrose (estrela), rompimento da parede dos vasos sanguíneos (seta azul), presença de hemácias no interstício caracterizando hemorragia (seta preta), presença de células inflamatórias (seta vermelha) infiltrado inflamatório e células com edema. C – músculos tratados com FBM: onde mostra proteção parcial dos efeitos do veneno. As alterações acima descritas aparecem com menor intensidade. D e E – músculos tratados com OZO: mostrando também proteção dos efeitos do veneno. Observa-se algumas células com edema e células com diâmetros normais, hemorragia (seta) com menor intensidade sem presença de células inflamatórias. F – músculos tratados com veneno+FBM+OZO: onde mostra que o diâmetro das células estão normais, sem presença de hemácias e infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos intactos com presença de hemácias (estrela). A, B, C e F 400x; D e E 100x. H. E.



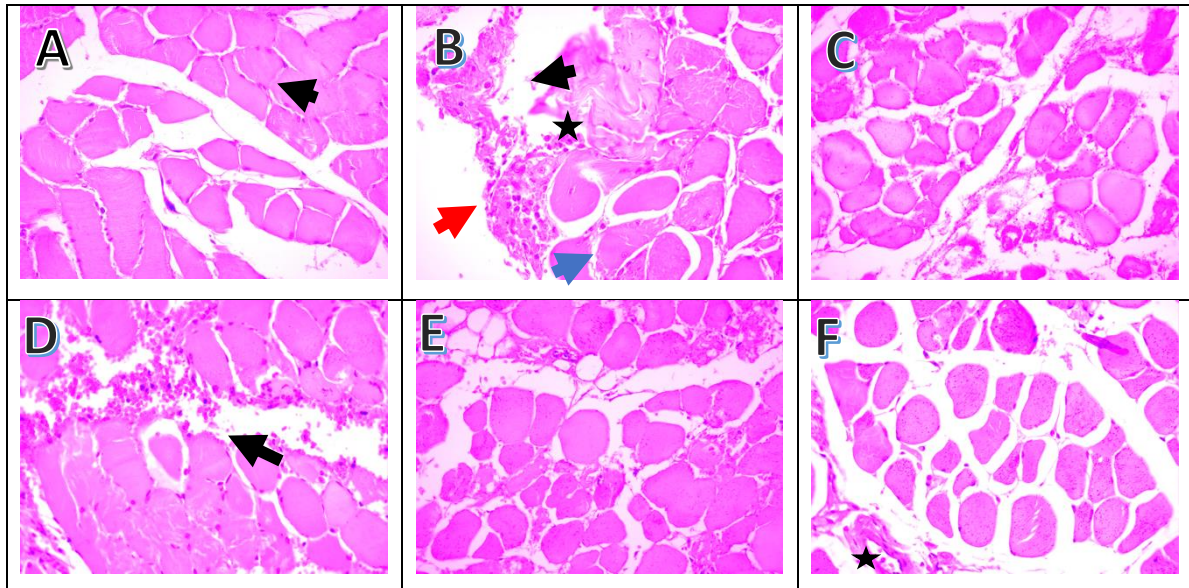
Fonte: próprio autor

Após 24 horas da inoculação, as células dos músculos que receberam o veneno continuavam com as alterações características do mesmo como acima descrito comparadas com o grupo controle (Figura 5 A e B).

Tanto a FBM, o OZO como a associação desses dois tratamentos foram eficazes em proteger as células (Figura 5 C, D, E e F).

Figura 3: Cortes histológicos transversais dos músculos injetados com veneno de *B. jararussu* - tempo 24 horas: A – Controle: observa-se morfologia normal, como observada na Figura 5 B – músculo injetado com veneno: após 24 horas da ação do veneno, observa-se mionecrose e alterações semelhantes às de 3 horas como rompimento da membrana celular (seta verde), degradação da célula caracterizando a mionecrose (estrela), rompimento da parede dos vasos sanguíneos (seta azul), presença de hemácias no interstício caracterizando hemorragia (seta preta), presença de células inflamatórias (seta vermelha), infiltrado inflamatório e células com edema. C – Músculos tratados com FBM: o laser promoveu proteção parcial contra os efeitos do veneno após 24 horas da sua inoculação. D e E – Músculos tratados com OZO: a proteção inicial do OZO ozonizado contribuiu para que os efeitos do veneno fossem amenizados. Observa-se células com diâmetros normais com pouco infiltrado inflamatório. F – músculos tratados com veneno+FBM+OZO: nesse caso, observa-se uma proteção igual ao que foi analisado em

D e E. Diâmetro das células estão normais, sem presença de hemácias e infiltrado inflamatório (estrela). A, B, C e F 400x; D e E 100x. H. E



Fonte: próprio autor.

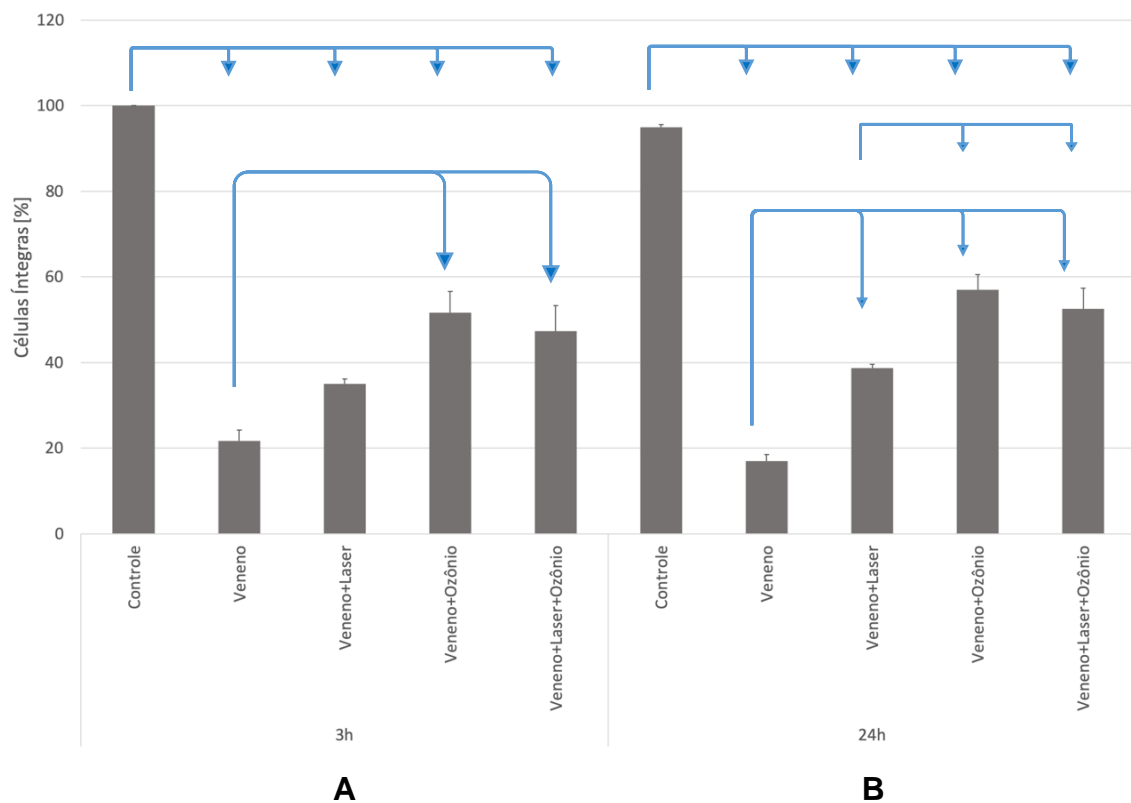
5.2.2 Quantificação da mionecrose

A Figura 6 mostra a quantificação da mionecrose onde verificamos que o veneno realmente diminuiu a quantidade de células normais, mostrando intensa necrose das células musculares nas primeiras 3 horas. Neste caso cerca de 80% das células sofreram a ação do veneno. Com o tratamento utilizando a FBM, houve uma discreta proteção que não teve diferença estatística com o grupo controle. Já o tratamento com apenas o OZO ou associado a FBM promoveram uma proteção de cerca de 50% sendo observado diferença estatística (Figura 6 A).

Após 24 horas, o número de células com mionecrose que sofreram ação do veneno continuava alto, mas neste caso, observamos que o tratamento com FBM começou a proteger as células mostrando um efeito fotobiomodulador mais tardio do que o OZO e a associação dos dois (Figura 6 B).

Nos tempos observados, não ocorreu uma somatória e um efeito sinérgico dos dois tratamentos uma vez que o tratamento somente com o OZO não foi estatisticamente diferente do tratamento com o OZO+FBM (Figura 6 B).

Figura 4: Quantificação de células integras e alteradas pelo efeito do veneno de *B. jararacussu*: As células de vários campos foram contadas e realizada a relação entre as células normais e as células que sofreram ação do veneno. Foram consideradas células alteradas aquelas que as membranas estavam rompidas ou células com estágio de degradação avançado. A – 3 horas após o tratamento: Os grupos de células que foram tratadas com OZO foram estatisticamente diferentes do grupo veneno, mostrando a proteção promovida pelo OZO. Nesse tempo, a FBM aplicada não foi estatisticamente diferente do grupo veneno. B – 24 horas após o tratamento: A proteção do OZO foi mais evidente mostrando uma proteção de aproximadamente 60% quando comparado com o controle. Não foi observado efeito sinérgico da associação do OZO com a FBM. O efeito da FBM nesse tempo foi mais evidente sendo diferente estatisticamente do grupo veneno. Isso mostra um efeito protetor tardio da FBM ($p < 0,05$).



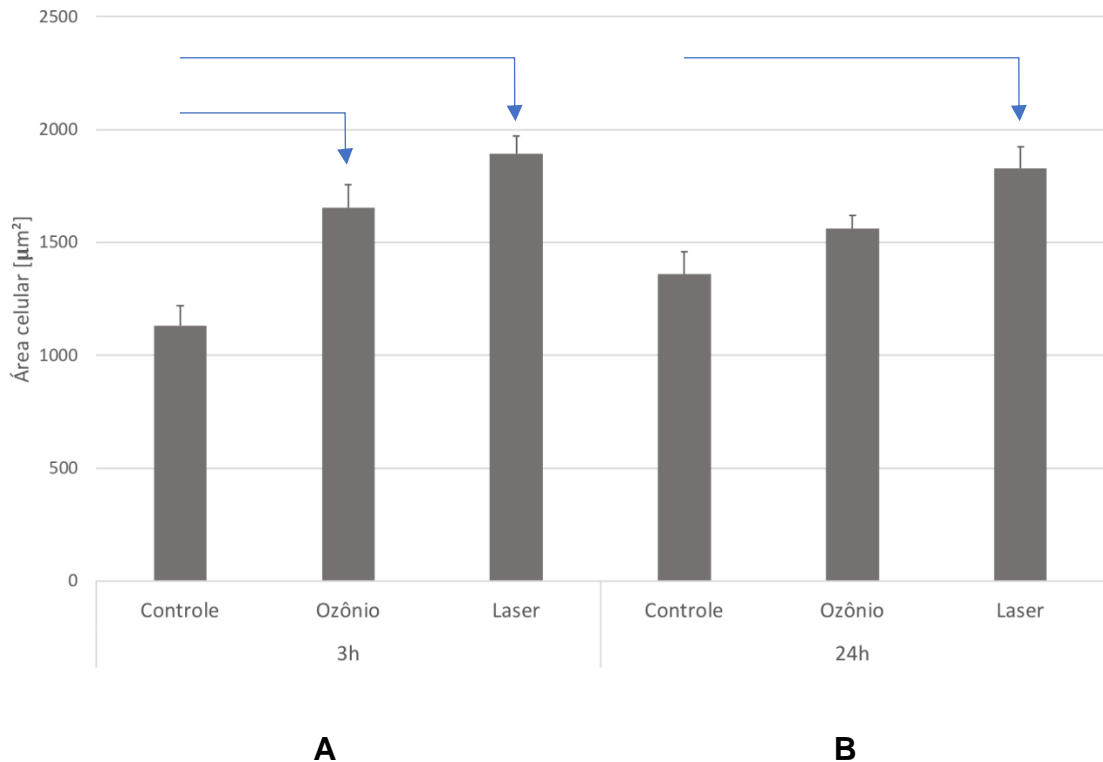
Fonte: próprio autor

A aplicação do OZO ozonizado protegeu as células da ação do veneno, tanto em 3 horas como em 24 horas. Esta proteção foi significativamente melhor que a observada apenas pelo grupo da FBM. O efeito protetor do OZO sozinho ou associado com a FBM foi superior que a com somente FBM.

5.2.3 Quantificação do edema através da medida da área celular

A observação nas lâminas histológicas de células musculares que foram inoculadas com veneno tem o diâmetro maior do que as normais, que levou a mensurar a área dos cortes transversais dos músculos. Observa-se que no tempo de 3h após a inoculação, a simples aplicação do OZO ou da FBM promoveu discreto edema celular, efeito que não foi visto com as células tratadas com OZO após 24 horas (Figura7).

Figura 5: Mensuração da quantidade de células íntegras avaliada pela medida da área celular: A – células que sofreram os efeitos da FBM e do OZO após 3 horas mostrando que a aplicação desses agentes promoveu aumento do volume e conseqüentemente da área das células. B – área das células 24 horas após o tratamento. Observa-se que o volume celular voltou igual ao controle estatisticamente após tratamento com o OZO, ($p>0,05$) mas não com o tratado com a FBM ($p<0,05$).

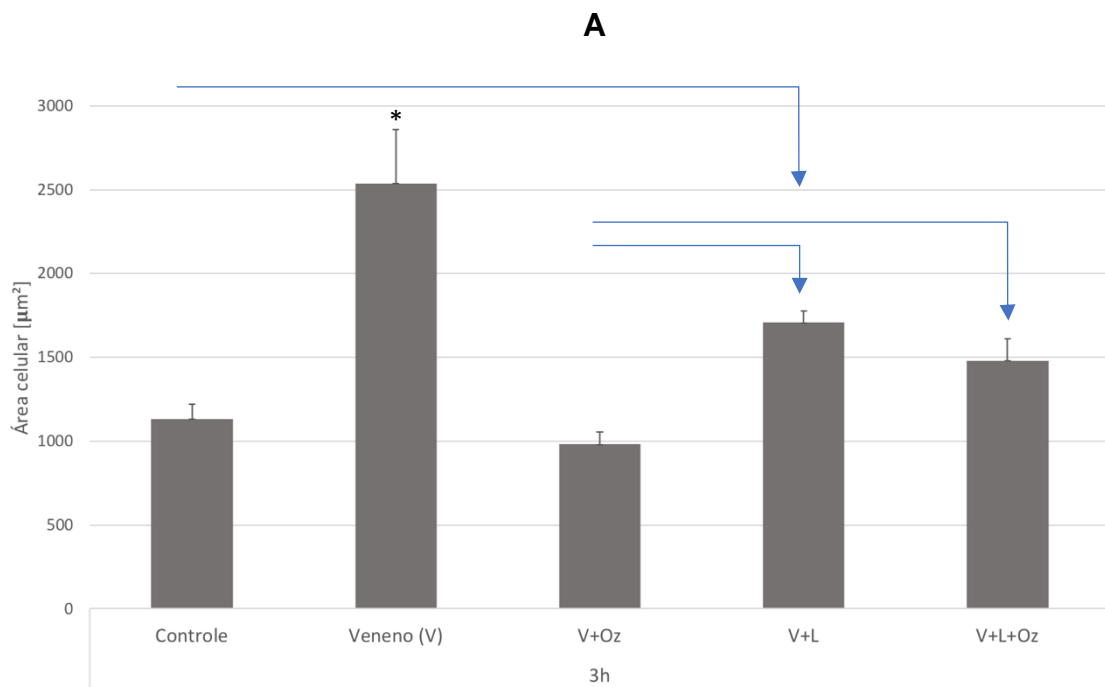


Fonte: próprio autor

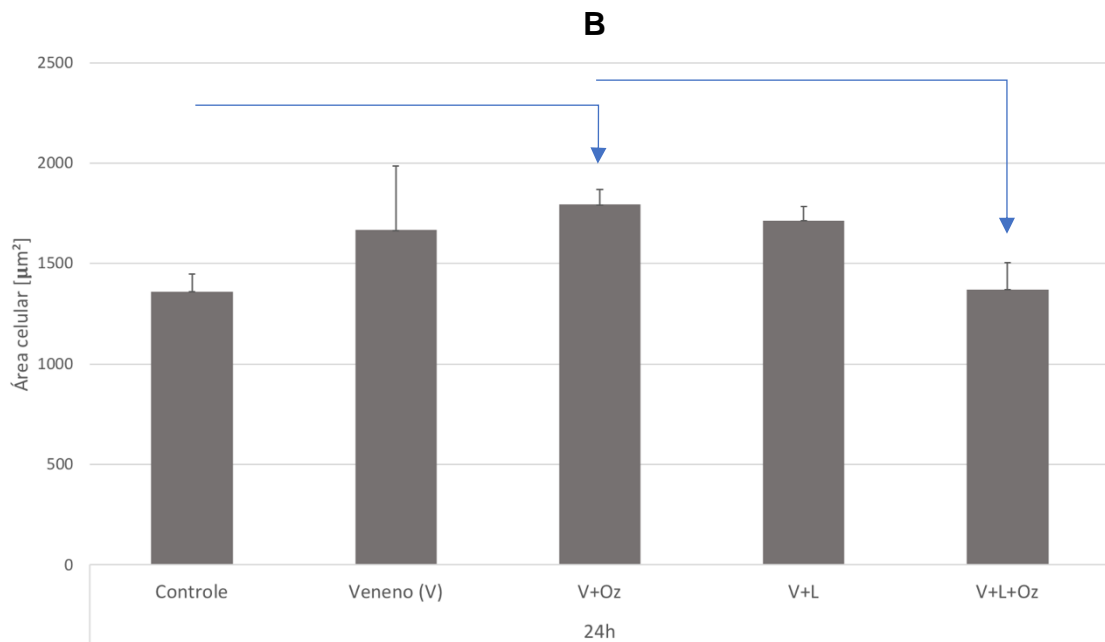
Quando foi analisado a área das células 3 horas após a inoculação do veneno, observa-se que o grupo tratado somente com o OZO, foi estatisticamente diferente dos grupos tratados com a FBM e OZO com a FBM (Figura 8A). Após 24 horas dos tratamentos, foi observado que o edema promovido pelo veneno, não era tão intenso como no de 3 horas. No entanto, neste tempo, o OZO promoveu discreto edema em relação ao controle. Por sua vez, o tratamento com somente FBM ou associado ao OZO, diminuiu o número de células edemaciadas, não sendo observado diferença estatística com o grupo controle. Isto mostra talvez, um efeito tardio da FBM em diminuir o edema celular (Figura 8 B).

Figura 6: Quantificação de células íntegras avaliada pela medida da área celular: A – células que sofreram diversos tratamentos 3 horas após a inoculação do veneno. A área celular aumentou consideravelmente quando os músculos foram tratados somente com o veneno. No grupo que foi aplicado somente o OZO, foi observado uma redução da área ($p < 0,05$). No grupo tratado com FBM ou no grupo tratado com FBM+OZO houve redução da área, ($p < 0,05$) mas não como a redução promovida

somente pelo OZO ($p < 0,05$). Apenas a FBM foi estatisticamente diferente quando comparada com o grupo controle, indicando que a proteção promovida pelo OZO foi mais eficaz ($p < 0,05$). B – área das células 24 horas após o tratamento. Observa-se que o volume celular no grupo tratado com OZO não apresentou diferença estatística quando comparado com o veneno, ($p > 0,05$) mas quando comparado com o grupo controle, verifica-se diferença estatística, ($p < 0,05$) não sendo observado efeito protetor frente ao veneno. A área do grupo FBM não apresentou diferença estatística com o grupo tratado somente com OZO ($p > 0,005$) e o grupo FBM e OZO apresentou diferença estatística com o grupo tratado somente FBM ($p > 0,005$).



Fonte: próprio autor

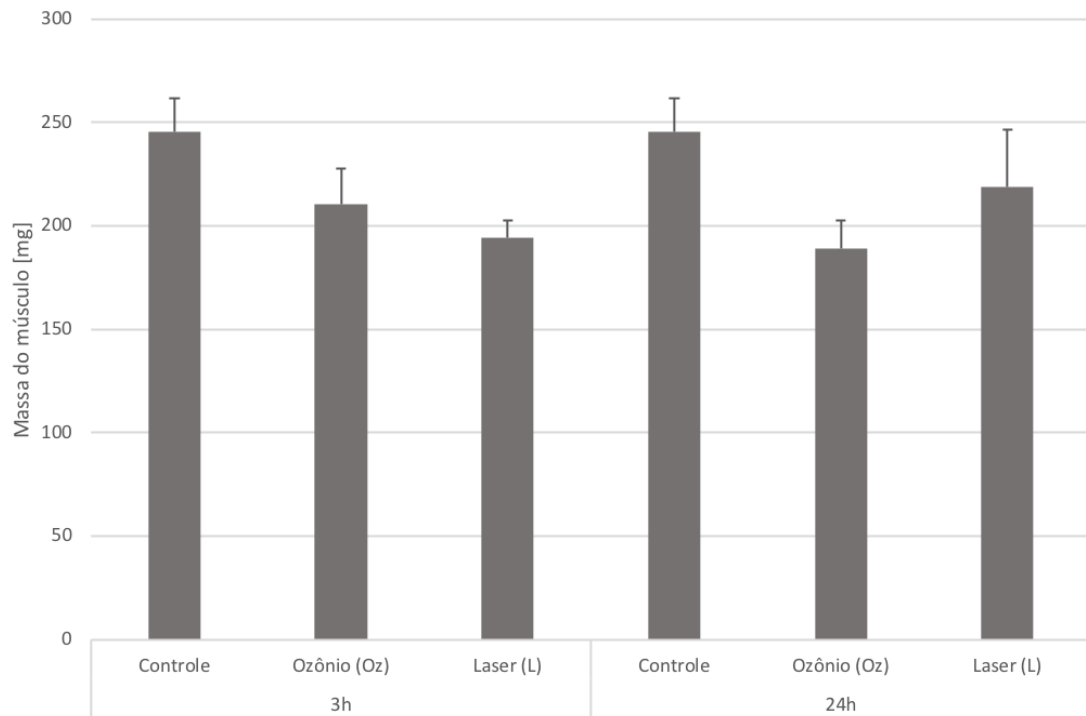


Fonte: próprio autor

5.2.4 Quantificação do edema através do peso do músculo

Ao final de 3 horas e 24 horas, os músculos foram cuidadosamente retirados e pesados. Os pesos dos músculos não sofreram alterações nos grupos tratados somente com OZO ou com a FBM (Figura 9).

Figura 7: Peso dos músculos tratados somente com OZO e somente com FBM – 3 horas e 24 horas. Os músculos retirados foram pesados e verificado o peso. Como é observado, o peso dos músculos não teve diferença estatística quando comparado com o grupo controle tratado com o OZO ou com a FBM. Não foi observado diferença estatística entre os grupos nos tempos estudados.

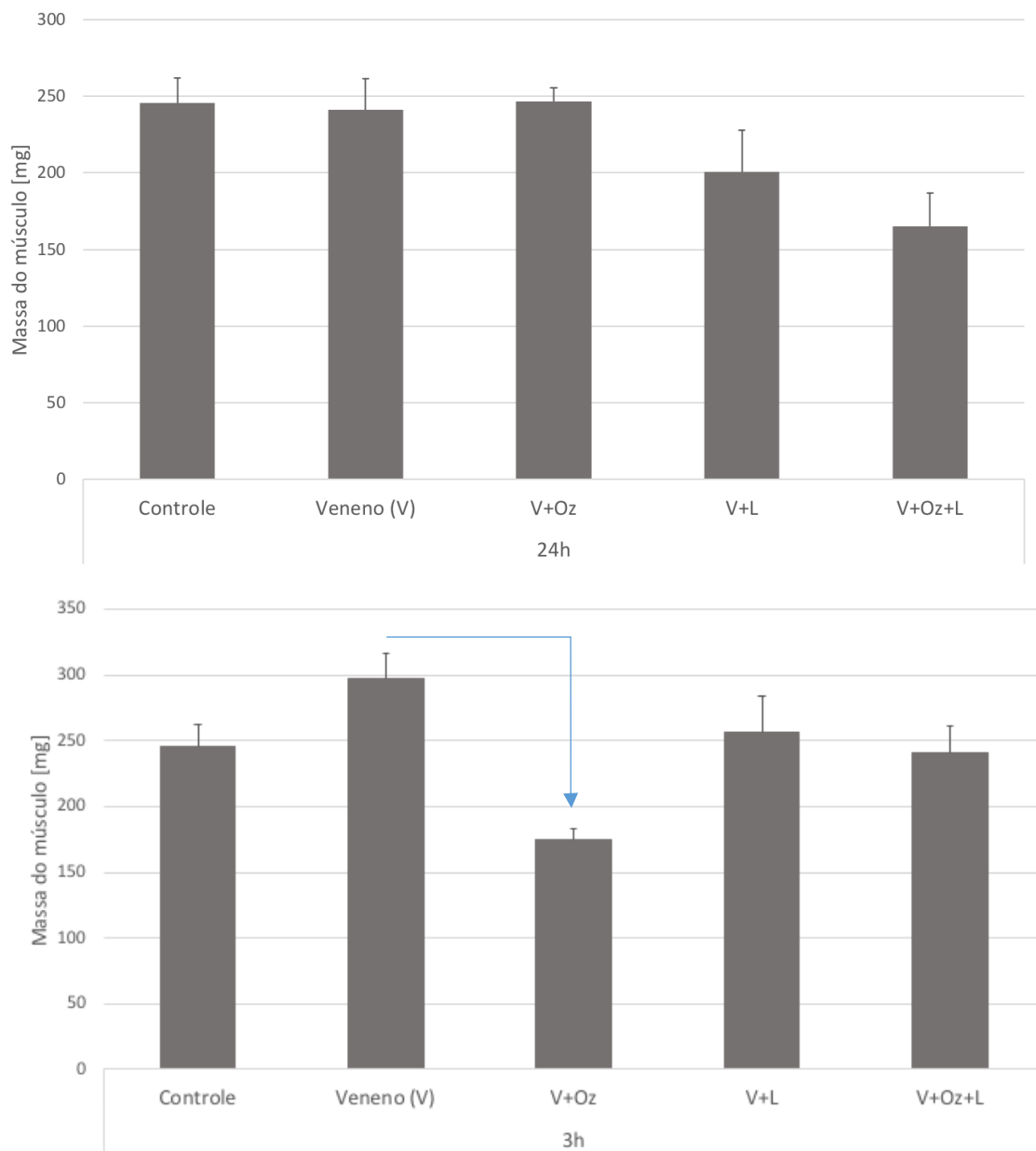


Fonte: proprio autor

Por sua vez, os músculos tratados com veneno tiveram aumento de peso, mas não foi estatisticamente diferente do controle. Isso foi observado também com os grupos tratados somente com FBM e nos grupos onde foram aplicados os dois tipos de tratamentos, tanto no tempo de 3 horas como no de 24 horas (Figura 10).

No entanto, observa-se diferença estatística entre os grupos veneno e tratados somente com OZO (Figura 10).

Figura 8: Peso dos músculos tratados somente com OZO ou com FBM – 3 horas: Após os tratamentos, os músculos foram retirados dos camundongos e pesados. Houve proteção do OZO no tempo de 3 horas promovendo diminuição estatisticamente diferente do peso do músculo em relação ao grupo veneno ($p < 0,05$). No tempo de 24 horas não foi observada essa proteção ($p > 0,05$). Não foi observado diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).



Fonte: próprio autor

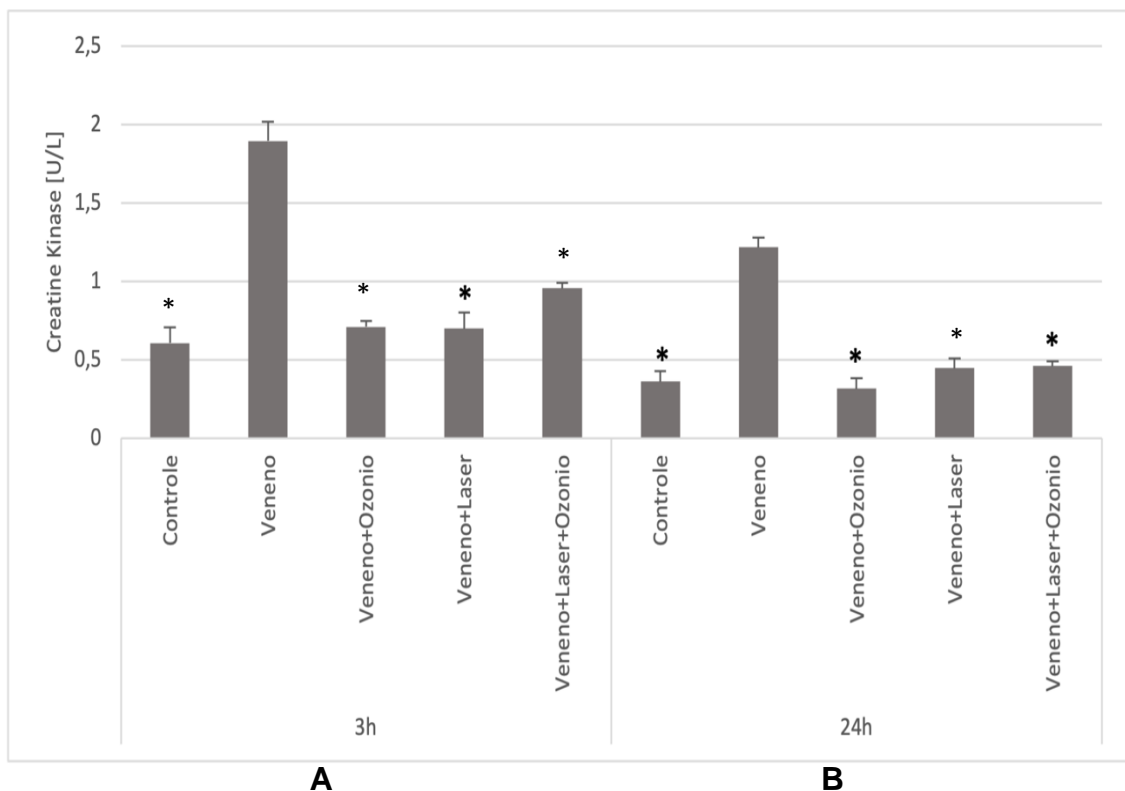
5.2.5 Análise bioquímica - CK

As enzima CK é uma enzima intracelular que é encontrada na corrente sanguínea quando o músculo sofre algum tipo de trauma. A sua quantificação informa o quanto as células foram lesadas.

Em nosso experimento, o sangue dos camundongos foi retirado, centrifugado e o plasma separado. A partir disso, essa enzima foi quantificada.

Observa-se que o veneno induz a liberação dessa enzima, certamente devido ao seu efeito mionecrótico. Todos os tratamentos realizados protegeram as células da liberação de CK tanto nas 3 primeiras horas como nas 24 horas (Figura 11 A).

Figura 9: Liberação de CK pelos músculos: O veneno da *B. jararacussu* promoveu liberação de CK das células e todos os tratamentos foram eficazes de inibir essa liberação tanto em 3 horas como após 24 horas ($p < 0,05$).



Fonte: próprio autor

O tratamento somente com o OZO ou com a FBM foi eficaz em inibir a sua liberação comparado com o grupo veneno ($p < 0,05$). Entretanto, a associação dos dois tratamentos não foi eficaz ($p < 0,05$), comparado com o grupo veneno.

Comparando com os grupos controles, o grupo veneno e tratados com o OZO+FBM apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) mostrando uma liberação dessa enzima. Após 24 horas os níveis de CK voltaram ao normal para todos os grupos ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

No envenenamento por serpente do gênero *Bothrops sp*, observa-se mionecrose, inflamação e hemorragia, podendo esses efeitos serem classificados de grau leve, moderado e grave. Estudos em animais experimentais indicam que a administração de antiveneno logo após a mordida da serpente protege das manifestações do envenenamento sistêmico, mas tem pouco efeito sobre as respostas e danos dos tecidos locais (BARBOSA et al., 2009; BULGARELLI et al., 2010; GUTIERREZ et al., 2007; PICOLO et al., 2002; ZAMUNER et al., 2004).

Neste estudo, pode-se verificar os efeitos favoráveis e a capacidade do OZO sozinho ou em associação com a FBM em atenuar os danos locais do veneno da serpente.

Os estudos clínicos indicam que o tempo ideal para o paciente mordido pela serpente seja atendido no hospital e iniciado a soroterapia seja dentro de 3 horas (PACHECO e ZORTEA, 2008; MISE et al., 2018). Por esta razão, foi escolhido o intervalo de 3 horas após o envenenamento para avaliar as respostas ao veneno na ausência e presença de tratamento.

Foi examinado também as respostas em 24 horas após o envenenamento, um intervalo que tem sido utilizado como um prazo para avaliar as respostas aguda do veneno da *Bothrops sp* (BARBOSA et al., 2008, 2009).

A análise histológica revelou uma intensa reação inflamatória após a inoculação do veneno que foi provavelmente mediada pelas atividades proteolíticas, coagulantes e hemorrágicas do veneno.

Relatos mostram os benefícios dos medicamentos plantas e outras abordagens, tais como a FBM com uma medida potencial de auxiliar ou sendo coadjuvante para o tratamento de mordidas de serpentes, em conjunto com terapia antiveneno padrão (FERREIRA-RODRIGUES et al., 2016; TRIBUANI et al., 2017; FERRAZ et al., 2015). Por exemplo, uma isoflavona isolada da planta *Dipteryx alata* (Vogel) neutraliza a neurotoxicidade e a miotoxicidade do veneno da *B. jararacussu* e a sua principal toxina (bothropstoxin I, BThTX-I, uma fosfolipase A2 miotoxina) em

preparação de diafragma nervoso frênico de rato (FERRAZ et al., 2014; NAZATO et al., 2010).

A FBM tem sido estudado experimentalmente como possível tratamento para o envenenamento de mordidas de serpentes e mostrou resultados promissores devido a sua capacidade em modular as reações bioquímicas celulares por meio de processos fotoquímicos e fotofísicos a partir da absorção da radiação laser de baixa potência, com comprimento de onda e doses específicas, que modulam o metabolismo das células irradiadas. A capacidade da FBM de reduzir os efeitos inflamatórios e mionecróticos locais da *B. jararacussu* e BthTX-I tem sido estudado *in vivo* e *in vitro* (BARBOSA et al., 2008; 2009; 2010; SANTOS et al., 2018; BULGARELLI et al., 2010).

A FBM com laser de diodo ou semiconductor de baixa potência, com comprimento de onda vermelho (685 nm), dose de 4,2 J/cm², em combinação com o antiveneno (AV), reduziu significativamente a mionecrose causada pelo veneno da *B. jararacussu* no estudo de BARBOSA et al. (2009). Do mesmo modo, tratamento com LED com comprimentos de onda vermelho ou infravermelho após a inoculação da *Bothrops asper* reduziu a formação do edema na região plantar e atenuou significativamente a migração de neutrófilos e hiperalgesia como observado no estudo de SANTOS et al. (2018).

Como aqui observado, a FBM reproduziu os resultados descritos na literatura que inclui a proteção contra a destruição da membrana celular, mionecrose, uma redução do infiltrado inflamatório e edema intracelular. Os efeitos benéficos da FBM são mediados pela absorção da radiação laser por cromóforos celulares, principalmente a enzima citocromo c-oxidase ativando os processos de síntese de ATP na mitocôndria, e a partir disso, modulando uma série de reações intracelulares. Tais reações geram processos fotoquímicos e/ou fotofísicos que modulam a atividade celular, podendo ativar ou inibir processos celulares específicos. Sendo observado por exemplo efeitos do crescimento e liberação de fatores antinecrose, além de inibir os processos inflamatórios, estimulando a angiogênese, e a divisão, diferenciação e proliferação de fibroblastos (ANDERO et al., 2018; ARANHA et al., 2012; AVCI et al., 2013; BARBOSA et al., 2008; 2009; 2010; BULGARELLI et al., 2010; NABUR-ANDRADE et al., 2012; 2013; SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2011; VIERIA et al., 2018; WALSKI et al., 2019).

Geralmente, a resposta biológica depende das características do laser (comprimento de onda de luz, dose e modo de irradiação) e fatores celulares, tais como a extensão da absorção da luz, o estado metabólico geral da célula e as condições fisiológicas e nutricionais globais do indivíduo. As respostas clínicas precisam de tempo para serem observadas devido às vias celulares envolvidas na resposta ao laser (AVCI et al., 2013; BARBOSA et al., 2008; 2010; MENEGUZZO et al., 2013).

O OZO pode melhorar o metabolismo do oxigênio ao estimular as enzimas envolvidas neste processo. Isso leva ao aumento da saturação de oxigênio na corrente sanguínea e mais oxigênio a ser levado para as células, melhorando assim a oxigenação e a respiração celular. Esta oxigenação melhorada não só dinamiza o fluxo sanguíneo na circulação geral, mas também neutraliza os mediadores neuroquímicos da dor e contribui para o metabolismo e eliminação de mediadores inflamatórios (como por exemplo, a bradicinina). Com base nesses efeitos, o óleo ozonizado tem sido utilizado como uma terapia complementar para tratar certos tipos de dor crônica (KIM et al., 2009; RIPAMONTI et al., 2012; SEDIDLER, et al., 2008; ZENG e LU, 2018).

A aplicação do OZO no local onde foi inoculado o veneno, atenuou em 60% a mionecrose causada pelo veneno da *B. jararacussu*, presumivelmente através da sua capacidade de penetrar rapidamente na pele e inibir as ações das toxinas.

O OZO também reduziu a formação do edema induzido pelo veneno. Quando os dois tratamentos (OZO+FBM) foram em conjunto, não foi observado sinergia na proteção em comparação apenas com o OZO. Esta falta de sinergia entre os dois tratamentos refletiram provavelmente diferenças no curso temporal das suas interações com o tecido danificado por veneno.

Especificamente, os compostos oxidantes do OZO provavelmente atenuou nas fases iniciais dos danos induzidos pelo veneno e por um curto período, enquanto as respostas a irradiação com FBM muito provavelmente atuando mais tardiamente na modulação das respostas celulares que são dependentes das condições celular, bem como sobre fatores físicos como o comprimento de absorção de onda, a dose de energia aplicada, tempo de aplicação, o número de intervalo entre as sessões (DE

SOUZA et al., 2011; SOUZA et al., 2011; AVCI et al., 2013; MENEGUZZO et al., 2013; TARADAJ et al., 2018; WALSKI et al., 2019).

A proteção imediata do OZO em comparação com a FBM bem como os efeitos benéficos posteriores desse último, estavam também muito provavelmente relacionados com as diferenças temporais nos mecanismos de proteção que contribuíram para a falta de sinergia entre os dois tratamentos, como já foi mencionado acima.

Uma limitação desse estudo foi a realização do tratamento imediatamente após a inoculação do veneno, ou seja, sem intervalo entre o envenenamento e a terapia complementar, enquanto na vida real, há situações que existe um intervalo prolongado (horas até dias) entre o envenenamento e o primeiro tratamento médico (terapia antiveneno e medidas complementares).

Estudos anteriores mostraram que a terapia da FBM com laser de baixa potência ou LED aplicado 30 minutos após o envenenamento experimental foi capaz de atenuar os efeitos locais induzidos pelo veneno (SOUZA et al., 2011; NADUR-ANDRADE et al., 2012; 2013). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar se o OZO aplicado em vários intervalos após o envenenamento seria capaz de reverter os danos locais dos tecidos causado pelo veneno.

Caso as descobertas desse trabalho sejam confirmadas através das investigações subsequentes, o OZO poderia ser uma medida útil de primeiros socorros para as pessoas que ficarem em risco de mordida de serpente, onde poderia usar o OZO em um frasco portátil e utilizar imediatamente após o acidente ofídico atenuando assim o efeitos locais do envenenamento até poderem receber tratamento médico convencional no hospital.

O OZO na forma gasosa ou dissolvido em água ou óleo é altamente instável. Durante a ozonização do óleo vegetal (tais como óleo de girassol aqui utilizado), o OZO reage com ácidos graxos presentes no óleo para causar oxidação lipídica que gera compostos oxidantes tais como ozonetos e peróxidos, sendo que tais compostos tem a capacidade de permanecer no óleo por meses, quando mantido em condições adequadas de temperatura.

Nos grupos OZO e OZO+FBM, os compostos oxidantes de OZO aparentemente interagiram com músculos envenenados para modificar as respostas bioquímicas celulares e atenuar a mionecrose induzida pelo veneno.

Embora somente a terapia da FBM oferecesse alguma proteção contra a mionecrose, não foi tão eficaz como o OZO sozinho. A falta de um efeito adicionado ou sinérgico quando o OZO e a FBM foram combinados, pode indicar que ambos os tratamentos compartilham efeitos intracelulares em comum na proteção celular. Na mionecrose, o OZO foi mais eficaz do que a FBM na atenuação do edema celular após 3 horas do envenenamento. A FBM atenuou o efeito benéfico do OZO neste intervalo de tempo. As razões para tal efeito são pouco claras atualmente. Estudos futuros deverão ser realizados para verificar e explicar melhor esses efeitos.

O ligeiro edema que persistiu às 24 horas não foi afetado pelo OZO ou pela FBM sozinho, mas foi atenuado pela combinação de ambos os tratamentos. A divergência entre as respostas de proteção observadas às 3 horas e 24 horas após o envenenamento pode refletir bem nas diferenças nos mediadores celulares envolvidos em cada intervalo de tempo.

A menor proteção global oferecida pela FBM em comparação com o OZO nesse estudo pode refletir parcialmente o intervalo de fatores que podem influenciar a eficácia da terapia laser, incluindo o comprimento de onda do laser, a energia de dose aplicada, o tempo de aplicação e condições fisiológicas da célula e dos tecidos-alvo, como os parâmetros, a idade do indivíduo, estado nutricional e estado metabólico, a intensidade dos danos causados e a resposta imunitária.

A respeito da liberação de CK pelas células musculares, é descrito na literatura que essa liberação é dependente do grau de lesão celular, ou seja, quanto maior a lesão sofrida pelas células musculares, maior será a liberação dessa enzima no plasma.

Observa-se que o veneno estudado não foi diferente, promoveu aumento dos níveis de CK no plasma, que foi inibido devido a proteção da destruição da membrana celular promovida pelos dois tipos de tratamento.

O presente estudo tem caráter pioneiro, pois avalia os efeitos do óleo ozonizado isolado ou associado à terapia de fotobiomodulação em células musculares atacadas

por veneno de serpente. Como não existe estudos anteriores sobre a associação do óleo ozonizado com a FBM, e com base em nossa hipótese, os compostos oxidativos do óleo ozonizado atuam previamente e por pouco tempo nas células musculares que estão sob ação do veneno, enquanto o laser de baixa intensidade. A energia durante o processo de irradiação é absorvida e promove efeitos fotoquímicos e/ou fotoelétricos nas células musculares, e então a FBM ocorre com diferentes respostas celulares, sendo efeitos tardios e totalmente baseados e dependentes das condições celulares (MENEGUZZO et al., 2013; TARADAJ et al., 2018; WALSKI et al., 2019).

É interessante saber que no grupo OZ+FBM, a FBM não irá interagir com ozônio, pois não há ozônio no tecido, mas haverá interação com compostos oxidativos presentes no tecido após a ação do óleo ozonizado e com células previamente atacadas pelo veneno em condições alteradas (BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; BULGARELLI et al., 2010; ARANHA et al., 2012; NADUR-ANDRADE et al., 2012; GIARETTA et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

No caso do presente estudo, a FBM não foi suficiente para modular e promover alterações fotoquímicas e fotoelétricas na célula frente à injúria e danos causados pelo veneno, sua modificação e respostas fisiológicas promovidas pelos compostos oxidativos do óleo ozonizado. Na FBM, deve-se considerar a absorção efetiva do comprimento de onda do laser de baixa potência, a dose-energia aplicada, as condições fisiológicas da célula e dos tecidos-alvo, deve ser ajustado os parâmetros seguros e eficazes para cada condição celular, como idade, nutrição, metabolismo e respiração celular, duração a intensidade do agente agressor e danos causados através da resposta imune.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo mostram que a FBM e/ou o OZO podem individualmente proteger parcialmente contra a mionecrose e o edema causados pelo veneno da *B. jararacussu*, com o OZO sendo mais eficaz, particularmente nas fases iniciais de envenenamento.

Poucos benefícios adicionais foram alcançados pela combinação dos dois tratamentos.

Os resultados apenas com o OZO são de potencial relevância clínica como tratamento inicial ao envenenamento ofídico na pré-clínica, uma vez que o OZO está facilmente disponível, fácil de armazenar e fácil de aplicar.

A utilização do OZO poderia ser benéfico para atenuar os efeitos deletérios da mionecrose contra os quais o antiveneno não atua.

A terapia tem uma eficácia limitada. São necessários estudos adicionais para avaliar a verdadeira eficácia do OZO na atenuação do impacto local, efeitos do envenenamento, com uma avaliação sistemática dos seus efeitos na formação de edemas, respostas inflamatórias, hemorragia e mionecrose.

REFERÊNCIAS

- ABOZ – Associação Brasileira de Ozonioterapia. 2021. <https://www.aboz.org.br/>. Accessed 29 Sept 2021.
- ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. Brasil, 2019. **Portal saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/acidentes-por-animais-peconhentos>. Acesso em set.2021.
- ANDERO, L.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; RIBEIRO, B. G.; BENITTE, A.; NOGUEIRA, T. F.; FRANÇA, C. M.; SILVA, D. F. T.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; CORRÊA, F. I.; CORRÊA, J. C. F. Effects of myogenic precursor cells (C2C12) transplantation and low-level laser therapy on muscle repair. **Lasers Surg Med**. v. 50(7), p.781–91, 2018.
- ARANHA, S.E.; BITTENCORT, J.A.; SEABRA, O.N.K.; CORREIRA, H.S.V., dos SANTOS, P.L.C.; LOBATO, C.P., RIBEIRO, Ribeiro J.R.; PEREIRA.W.L.A.; CARVLHO, J.C.T.; da SILVA, J.O. Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom. **Photochem Photobiol Sci**. v. 12(10), p. 1895–1902, 2012
- AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg**. v. 32(1), p. 41–52, 2013.
- AZARPAZHOOH, H.L. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **J. Dent**. 36 (2):104-16, 2008.
- BARBOSA, A. M; VILLAVERDE, A. B.; GUIMARÃES-SOUZA, L.; RIBEIRO,

W.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v.51, p.1236-1244, 2008.

BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; SOUSA, L.G.; MUNIN, E.; FERNANDEZ C. M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Photomed Laser Surg.** v. 27(4), p. 591–7, 2009.

BARBOSA, A. M.; VILLAVERDE, A. B.; GUIMARÃES-SOUSA, L.; SOARES, A. M.; ZAMUNER, S.F.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** v. 16(3), p. 470–9, 2010.

BERNARDE, P.S. **Acidentes Ofídicos. 2009 . Tese (Doutorado)**- Laboratório de Herpetologia – Centro Multidisciplinar - Campus Floresta. Universidade Federal do Acre – UFAC, 2009.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Med Res Rev.** 29(4), p. 646-82, 2009. doi: 10.1002 / med.20150.

BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.** 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2011.

BULGARELLI, D.; BARBOSA, A. M. B.; CARLOS, F. P.; ZAMUNER, S. F.; LIMA, C. J. L.; ZAMUNER, S. R. Efeito da terapia LED (Light Emitting Diode) na mionecrose e edema induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, no músculo gastrocnêmio. Terapia LED na mionecrose induzida por veneno. **Ter Man.** v. 8(37), p. 217-223, 2010.

CAMPOS, G. R. S.; MOURA, K. M. B.; BARBOSA, A. M.; ZAMUNER, L. F.; Nadur-ANDRADE, N.; DALE, C. S.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVANTES, M. C.; ZAMUNER, S. R. Light emitting diode (LED) therapy reduces local pathological changes induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. v. (152), p. 95-102, 2018. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.029.

CARDOSO, J. L.C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. A. & HADDAD Jr., V. **Animais Peçonhetos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 2.ed. Ed. Sarvier, São Paulo, 2009.

CARDOSO, M. G.; OLIVEIRA, L. D.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 105(3), p. 85-91, 2008.

CHIPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull World Health Org**. 1998;76(5):515–24.

CHIPAUX, J.P. Impact of the environment on envenomation incidence and severity. **Med Sci**. v. 25(10), p. 858–62, 2009.

CHIPAUX, J.P. Epidemiological investigation on envenomation: from theory to practice. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v. 18(4), p. 446–50, 2012.

COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H. M. F.; HYSLOP, S.; NUCCI G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochemie**, v.88(12), p. 1947-1959, 2006.

De SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.; Dos SANTOS, P.; DJr, CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodelling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci**. v. 26(6), p. 803–814, 2011.

DOURADO, D. M.; FÁVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. **Lasers in surgery medicine**, v. 33(5), p. 352- 357, 2003. doi: 10.1002 / lsm.10237.

FERRAZ, M. C.; YOSHIDA, E. H.; TAVARES, R. V.; COGO, J. C.; CINTRA, A. C.; DAL BELO, C. A.; FRANCO, L. M.; SANTOS, M. G.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; HYSLOP, S.; PUEBLA, P.; SAN FELICIANO, A.; OSHIMA-FRANCO, Y. An isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is active against the in vitro neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and bothropstoxin I and prevents venom-induced myonecrosis. **Molecules**. v. 19, p. 5790–805, 2014.

FERRAZ, M. C.; OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, J. J. R.; COGO, J.C.; SANTOS, M. G.; FRANCO, L.M.; PUEBLA, P.; FERRAZ, H.O.; FERRAZ, H. G.; ROCHA, M. M. T.; HYSLOP, S.; SAN FELICIANO, A.; OSHIMA-FRANCO, Y. The triterpenoid betulin protects against the neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* snake venom in vivo. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015.

FERREIRA-RODRIGUES, S. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, M. G.; GAUTUZ, J. A. A.; SILVA, M. G.; COGO, J. C.; BATISTA-SILVA, C.; SANTOS, C. P.; GROPPPO, F. C.; COGO-MULLER, K.; OSHIMA-FRANCO, Y. Anti-inflammatory and antibothropic properties of *Jatropha elliptica*, a plant from Brazilian cerrado biome. **Adv Pharm Bull**. v.6 (4), p. 573–9, 2016.

GARCEZ, A., RIBEIRO, M.S., NUNEZ, S.C. Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clinicas na odontologia. **Elservier**, Rio de Janeiro, 1ª ed. 2012.

GIARETTA, V. M. A; SANTOS, L. P.; BARBOSA, A. M.; HYSLOP, S.; CORRADO, A.P.; GALHARDO, M. S.; NICOLAU, R. A.; COGO, J. C. Low-intensity laser therapy improves tetanic contractions in mouse anterior tibialis muscle injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Res. Biomed. Eng**. v. 32(2), p. 153-160, 2016.

GUERRA, O. C.; CEPERO, S. M.; JORDÁN MEM, VÁZQUEZ, T. C. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. **Rev Cubana Estomatol.** v. 34(1), p. 21–4, 1997.

GUIMARAES-SOUZA, DALE C. S.; NADUR-ANDRADE N.; BARBOSA, A. M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Clin Exp Med Lett.** v. 52(3-4), p. 97-102, 2011.

GURLEY, B. Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? in: **journal of parenteral science and technology.** v. 39, p. 256-261, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ÂNGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr Pharm Des.** v. 13(28), p. 2935–50, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D.G.; WARREL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.** v. 3(6), p. 1502006, 2006.

HERNÁNDEZ, O.; GONZÁLEZ, R. Ozonoterapia En Úlceras flebostáticasin: Ver. **Cubana Cir,** v.40(2) p.123-129, 2001.

KIM, H. S. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute Cutaneous wound healing. **J Korean Med Sci.** v. 24(3), p. 368–74, 2009.

KOUYOUUMDJAIN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M. A.; GUIMARÃES, S. M. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). **Brazil.Trans R. Soc. Trop Med Hyg.** v. (85), p. 552, 1991.

MENEGUZZO, D. T.; ALMEIDA LOPES, L.; PALLOTA, R.; SOARES-FERREIRA, L.; LOPES MARTINS, R. A. B.; RIBEIRO, M.S. Prevention and treatment of mice paw

edema by near-infrared low-level laser therapy on lymph nodes. **Lasers Med Sci.** v. 28(3), p.973–80, 2013.

MILANI-JUNIOR, R. JORGE, F. P.; CAMPOS, F. P.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W. FRANÇA, F. O.; SANO-MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDEZ, C. L.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State. Brazil. **QJM.** v. 90(5), p. 323- 334, 1997.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. **Rev Panam Salud Publica.** v.42, p. 52, 2018.

MONACO, L. M; MEIRELES, F. C.; ABDULLATIF, M. T. G. V. Animais venenosos: serpentes, anfíbios, aranhas, escorpiões, insetos e lacraias. 2.ed. **Rev.Ampl**, Instituto Butantan, São Paulo, 2017.

NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A. M.; CARLOS, F.P.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Med Sci.** v. 27(1), p.65–70, 2012.

NADUR-ANDRADE, N.; ZAMUNER, S.; TONIOLO, E.F.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; DALE, C. S. Analgesic effect of light-emitting diode (LED) therapy at wavelengths of 635 and 945 nm on *Bothrops moojeni* venom-induced hyperalgesia. **Photochem Photobiol.** v. 12(10), p.895–902, 2013.

NAZATO, V.S.; RUBEM-MAURO, L, VIEIRA, N.A.G.; ROCHA-JUNIOR, D.S.; SILVA, M.G.; LOPES, P.S.; DAL-BELLO, C.A., COGO, J.C.; dos SANTOS, M.G.; CRUZ-HOFFLING, M.A.; OSHIMA-FRANCO, Y. “In vitro” antiophidian

properties of *Dipteryx alata*. Vogel Bark **Extracts Molecules**. v. 15(9), p. 5956–70, 2010.

NOGALES, C. G.; FERRARI, P. H.; KANTOROVICH, E. Q.; LAGE-MARQUES, J. L. Ozone therapy in medicine and dentistry. **J Contemp Dent Pract**. v. 9, p. 75–84, 2008.

NOGALES, C. G. **Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na endodontia**. 2011. Tese (Mestrando em Endodontia pela USP) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

NUÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. 1ª Edição, Editora Elsevier, p. 312, 2013.

OLIVEIRA, T. E.; COGO, J. C **Mecanismo de ação do edema induzido pela peçonha de *Philodryas olfersii* em camundongos**. 2015. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, 2015.

OGUZ, E, EKINCI, S., EROGLU, M., BILGIC, S., KOCA, K., DURUSU, M. Evaluation and comparison of the effects of hyperbaric oxygen and ozonized oxygen as adjuvant treatments in an experimental, **J Surg Res**. v. 171(1), p. 61- 8, 2011.

OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.P.; WALLACE, J.L.; GUTIERREZ, J.M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in edema-forming activity of *bothropic* venoms. **Toxicon**. v. 49(5), p.670-7, 2007.

PACHECO, U. P.; ZORTEA, M. Snakebites in Southwestern Goiás State, Brazil. **J Venom Anim Toxins Trop Dis**. v. 14(1), p. 141 2008 <https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000100011>.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Braz J Med Biol Res.** v. 35(10), p. 1221–8, 2002.

RIPAMONTI, C. I.; MANIEZZO, M.; PESSI, M. A.; BOLDINI, S. Treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) by medical ozone gas insufflation: a case report. **Tumori.** v. 98(3), p. 72-75, 2012.

SÁNCHEZ, M. P.; CORREA, L.; MACIEL, J.; MEORIN, L. N.; BASSI, A. P. F.; DEBONI, M. C. Z. Effect of ozonized oil in the management of experimental alveolar osteitis. Histologic and histomorphometric analysis. **J Arch Health Invest.** v. 2(1), p. 1, 2012.

SADOWSKA, J.; JOHANSSON, B.; JOHANNESSEN, E.; FRIMAN, R.; BRONIARZ-PRESS, L.; ROSENHOLM, J. B. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. **Chem Physics Lipids.** v.151, p. 85–91, 2008.

SANTOS, A.S.D.; GUIMARÃES-SOUSA, L.; COSTA, M.S.; ZAMUNER, L.F.; SOUSA, N.C.; HYSLOP, S.; SOARES, A.M.; CHAVANTES, M.C.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A₂ myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom: In vivo and in vitro evaluation. **Int J Biol Macromol.** v. 107(Pt B), p. 2020-2025, 2018.

SCROLLAVEZZA, P.; FERRARI, F.; MARTINI, F.M.; 1997; OGATA, A.; NAGAHATA, H., 2000; HERNÁNDEZ, O.; GONZÁLEZ, R., Efeitos da ozonioterapia **Sci.**, v.1, n.3, p. 211-216, 2002.

SECHI, L. A.; LEZCANO, I.; NUNEZ, N.; ESPIM, M.; DUPRÈ, I.; PINNA, A.; MOLICOTTI, P.; FADDA, G.; ZANETTI, S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). **J Appl Microbiol.** v. 9(2), p.2979–2934, 2001.

SEDIDLER, V.; LINETSKIY, E.; HUBÁLKOVÁ, H.; STANKOVA, H.; SMUCLER, R.; MAZÁNEK, J. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. **A Review Article Prague Med Rep.** v.109(1), p.5–13, 2008.

SILVA, L. M.; SILVA, C. A.; SILVA, A. D.; VIEIRA, R. P.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Photobiomodulation protects and promotes differentiation of C2C12 myoblast cells exposed to snake venom. **PLoS One.** v.11(4), 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0152890. e Collection 2016.

SOUSA, E. A. S.; BITTENCOURT, J. A. H. M.; OLIVEIRA, N. K. S.; HENRIQUES, S. V. C.; PIKANÇO, L. C. S.; LOBATO, C. P.; RIBEIRO, J. R.; PEREIRA, W. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; SILVA, J. O. Effects of a low-level semiconductor gallium arsenide laser on local pathological alterations induced by *Bothrops moojeni* snake venom. **Photochem Photobiol Sci.** v.12(10): 1895–1902, 2012.

SOUZA, L. G.; DALE, C. S.; NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A.M.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Clin Exp Med Lett*, v 52(3–4), p.97–102, 2010.

SOUZA, T. O.; MESQUITA, D. A.; FERRARI, R. A.; SANTOS PINTO, D. J. R.; CORREA, L.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P.; MARTINS, M. D. Phototherapy with low-level laser affects the remodelling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci.** v. 26(6), p. 803–814, 2011.

TARADAJ, J.; SHAY, B.; DYMAREK, R.; SOPEL, M.; WALEWICZ, K.; BEECKMAN, D.; SCHOONHOVEN, L.; GEFEN, A.; ROSIŃCZUK, J. Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. **Trial Int J Med Sci.** v. 15(11), p.1105–12, 2018.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions.** v. 26, p.292–300, 1989.

TRIBUIANI, N.; TAVARES, M.O.; SANTANA, M. N.; OLIVEIRA, I.C.F.; FILHO, J. A.; SILVA, M. G.; SANTOS, M. G.; COGO, J. C.; FLORIANO, R. S.; COGO-MULLER, K.; OSHIMA-FRANCO, Y. Neutralising ability of *Terminalia fagifolia* extract (Combretaceae) against the in vitro neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* venom. **Nat Prod Res.** v.31(23), p.2783–2787, 2017.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E., CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon.** v. 42(8), p. 947-62, 2003.

TUNER, J.; HODE, L. **The laser therapy handbook.** Grängesberg: Ed. Prima Books, p. 231, 2004.

VIEIRA, W. F.; KAGAWA, B. K.; COGO, J. C.; BARANAUSKAS. V.; HÖFLING, M. A. C. Low-Level Laser Therapy (904 nm) Counteracts Motor Deficit of Mice Hind Limb following Skeletal Muscle Injury Caused by *Snakebite-Mimicking* Intramuscular Venom Injection. **Received.** v. 11(7), 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0158980 July 8, 2016.

VIEIRA, W. F.; KENZO-KAGAWA, B.; BRITTO, M. H. M.; CERAGIOLI, H. J.; SAKANE, K. K.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Vibrational spectroscopy of muscular tissue intoxicated by snake venom and exposed to photobiomodulation therapy. **Lasers Med Sci.** v. 33(3), p. 503–12, 2018.

WALSKI, T.; DAŁBROWSKA, K.; DROHOMIRECKA, A.; JĘDRUCHNIEWICZ, N.; TROCHANOWSKA-PAUK, N.; WITKIEWICZ, W.; KOMOROWSKA, M. The effect of red-to-near-infrared (R/NIR) irradiation on inflammatory processes. **Int J Radiat Biol.** v. 95(9), p. 1326–36, 2019.

WHO Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2010.

WHO Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control: executive summary; 2019. Available at <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312195>. License: CC BYNC-SA 3.0 IGO. Accessed 29 Sept 2021.

ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions peritoneal leucocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S.R.; TEIXEIRA, C.F.P. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators inflamm.**, v.11(6), p. 351-35, 2002.

ZAMUNER, S. R.; CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. v. 44(3), p. 259-272, 2004.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**. v. 46(7), p.806-13, 2005.

ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARA, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**. v. 39, p. 1505–1513, 2017.

ZENG J, LU J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **Int Immunopharmacol**. v. 56, p.235–41, 2018.

ANEXO I



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 27 de novembro de 2019
CEUA N 6426070319

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Stella Regina Zamuner
Área: Medicina

Título da proposta: "Tratamento de lesão provocado pelo veneno da Serpente Bothrops jararacussu com uso de Ozônio e laser de baixa intensidade".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNINOVE (ID 000022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 19/novembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "No projeto original 6426070319 foram solicitados 58 camundongos machos e fêmeas para a realização de análises bioquímicas do sangue, análises de edema muscular e análise histológicas e histomorfométricas. Contudo, em consequência de intercorrências durante o procedimento cirúrgico em um dos grupos avaliados não foi possível realizar a medição do edema. Com isso ficou faltando um grupo de estudo, o que impossibilitará a conclusão do mesmo. Sendo assim, faz-se necessária a solicitação de uma quantidade adicional de animais (5 camundongos balbC Machos e Fêmeas com 12 semanas de vida) para a conclusão deste estudo. "

Comentário da CEUA: "O projeto foi ajustado e os animais solicitados são necessários para finalização dos experimentos. Não foi observado comprometimento ético. "

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho