

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MÍRIAN ÍVENS FAGUNDES

**NANOPARTÍCULAS DE OURO E AGENTES ELETROFÍSICOS
APLICADOS AO TRATAMENTO DA LESÃO CAUSADA PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararaca***

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

MÍRIAN ÍVENS FAGUNDES

**NANOPARTÍCULAS DE OURO E AGENTES ELETROFÍSICOS
APLICADOS AO TRATAMENTO DA LESÃO CAUSADA PELO
VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararaca***

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F156n Fagundes, Mírian Ívens.
Nanopartículas de ouro e agentes eletrofísicos aplicados ao tratamento da lesão causada pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* / Mírian Ívens Fagundes. - 2024.
95 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.
Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Cobras venenosas - Veneno - Efeito fisiológico. 2. Jararaca (Cobra). 3. Mordeduras e picadas - Tratamento. 4. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 5. Fotobiomodulação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.942

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **MÍRIAN ÍVENS FAGUNDES**, sob o título **“NANOPARTÍCULAS DE OURO E AGENTES ELETROFÍSICOS APLICADOS AO TRATAMENTO DA LESÃO CAUSADA PELO VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararaca*”** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

Criciúma, SC, 26 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br VANESSA MORAES DE ANDRADE
Data: 27/02/2024 13:31:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Data: 27/02/2024 22:06:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC

Karen Larissa Pereira de
Castro

Digitally signed by Karen Larissa Pereira
de Castro
Date: 2024.02.29 10:15:20 -06'00'

Profa. Dra. KAREN LARISSA PEREIRA DE CASTRO
Membro Externo – University of Texas Medical Branch

Prof. Dr. CARLOS DELFIN CHÁVEZ OLÓRTEGUI
Membro Externo – UFMG

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA
Data: 27/02/2024 10:05:57-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila
Orientador

Documento assinado digitalmente
gov.br EMILIO LUIZ STRECK
Data: 08/03/2024 16:36:39-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 aprovada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do PPGCS e no Biotério, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho aos meus pais que, entre tantos desafios que a vida lhes impôs, me ofereceram além do que eu poderia desejar.

AGRADECIMENTOS

Acredito que a parte mais importante deste trabalho não está descrita nas páginas de introdução, metodologia, resultados ou discussão. Esses quatro anos de doutorado contemplam tantas vivências que envolvem este trabalho, tornando-o ainda mais significativo por conta das pessoas que cruzaram o meu caminho nessa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus, que me sustentou em todos os aspectos durante essa etapa e em tantas outras.

Agradeço aos meus pais e espero honrá-los através das minhas ações. Ainda que não seja algo relacionado ao mérito, acredito não merecer tamanha generosidade de Deus ao cuidar com tantos detalhes desse aspecto em minha vida. Durante o doutorado, foram os meus pais que me ofereceram todo suporte que eu precisei e serei eternamente grata.

Ainda no que se refere à vida fora da universidade, agradeço aos meus poucos, mas suficientes, e bons amigos. À Lili por ser um poço de compreensão, amor, boas conversas e por ter um senso de humor que eu amo. Ao Mateus, por ser aquele amigo que ri de baboseiras, mas também para tudo para ajudar a resolver um problema. À Camila por ser uma amiga que se faz presente mesmo em meio a problemas e desafios diários, sempre disposta a ajudar no que preciso e a comemorar minhas conquistas. À Amanda por me apoiar nos meus sonhos e pelas conversas sempre produtivas e divertidas a respeito da vida. Eu só consegui concluir esta etapa porque tive o apoio de vocês durante o caminho.

Agradeço especialmente ao Professor Dr. Ricardo Andrez, que me orienta já faz oito anos, desde a iniciação científica. Foi no laboratório o local onde mais me desenvolvi, através do estudo, trabalho, da sua orientação e das amizades. Sempre serei grata pelas oportunidades, pela paciência, por todos os ensinamentos e pela dedicação à minha formação.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Peptídica, do qual faço parte. Para a execução do experimento realizado neste trabalho, eu recrutei absolutamente todo o grupo e todos foram extremamente colaborativos e contribuíram para que este trabalho fosse concluído. Especialmente em relação à participação neste trabalho, meus sinceros agradecimentos à Rahisa, Nathalia, Daysi, Camille, Lariane, Ellen, Yuna, Haylla, Mariana, Bruna, Maria Eduarda, Franciele e Jonathann.

Destaco meus agradecimentos à Ellen, responsável pela síntese das nanopartículas de ouro, fundamentais para a realização deste trabalho. Também enfatizo meus agradecimentos à Daysi por todas as contribuições e pela generosidade comigo no laboratório e além dele.

Agradeço ao Gabriel por compartilhar boas conversas, bom humor e discussões produtivas a respeito da vida e do trabalho. Também enfatizo meu agradecimento à Jéssica pelas conversas e pela disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço imensamente à Nathalia, que me acompanhou em todos os dias de experimento, segurando camundongos por horas seguidas, sem reclamar mesmo com as mãos doendo depois de horas imobilizando os animais. Além disso, agradeço pelos momentos compartilhados e pela dedicação durante todo o tempo de doutorado. Pela paciência, pelo incentivo e pela amizade, muito obrigada.

Especialmente, gostaria de agradecer à Rahisa por ser exatamente como é. Por compartilhar bons e maus momentos, por ser um exemplo de resiliência e de dedicação, por buscar sempre evoluir e levar todos que estão ao redor junto. Tua amizade me transforma a cada conversa e me renova para confiar e continuar adiante. Obrigada por estar sempre presente e por oferecer compreensão e discernimento diante de situações desafiadoras. Obrigada também pelas infinitas risadas, pelos almoços e lanches com boas conversas e discussões produtivas. Obrigada por estar presente além da universidade, por ser uma amiga para todos os momentos.

Aos que passaram pelo grupo e aos que estão presentes, agradeço a parceria e os aprendizados compartilhados. Lembrarei de todos sempre com muita gratidão e carinho.

Gostaria também de agradecer ao Eduardo, um grande amigo que conheci na graduação e mantive a amizade durante toda a trajetória de iniciação científica, mestrado e doutorado, e que me cativou pela sua generosidade e bom humor. Eu sei que alguns momentos da vida podem ser mais difíceis, mas a tua amizade sempre me mostrou que quando está difícil olhar para os nossos problemas, a compaixão e dedicação ao próximo podem ser uma forma de seguir adiante. Obrigada por sempre oferecer amor, afeto, amizade e generosidade. O mundo precisa de pessoas com o coração como o teu.

Meus sinceros agradecimentos também ao grupo de Proteção e Reparo Tecidual, coordenado pelo Professor Dr. Paulo Silveira, que colaborou imensamente com a execução deste trabalho nas análises bioquímicas e histológicas, bem como à Rubya e o Gustavo, que me ofereceram suporte essencial no primeiro dia de experimento.

Também agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Fisiopatologia Experimental com quem eu tive a oportunidade de conviver. Obrigada pelas conversas, apoio e pelas risadas, que com certeza deixam o ambiente de trabalho mais leve e agradável.

Agradeço também ao Professor Dr. Carlos Chávez Olórtgui por gentilmente disponibilizar a amostra de veneno de *Bothrops jararaca*, essencial para a execução deste trabalho.

Agradeço à UNESCO, especialmente ao PPGCS e à CAPES, por viabilizar a execução deste trabalho.

Finalizo agradecendo à banca examinadora pela disponibilidade e pelas contribuições.

RESUMO

Os acidentes com animais peçonhentos são um sério problema de saúde pública no Brasil. As serpentes do gênero *Bothrops* são consideradas peçonhentas e possuem veneno que causa diversas alterações fisiopatológicas, como lesões teciduais, hemorragia e necrose. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para quem sofre acidentes com serpentes é a soroterapia. O veneno botrópico é rico em diversos componentes prejudiciais para o organismo da vítima, como as metaloproteinases, que afetam e pioram a gravidade da lesão, podendo causar graves consequências, como a amputação. Devido à severidade dessas lesões e a falta de tratamento específico, surge a necessidade de novas terapêuticas. Nanopartículas de ouro, ultrassom e laser, vêm sendo utilizados como moduladores da resposta inflamatória. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de nanopartículas de ouro e agentes eletrofísicos para o tratamento da lesão dermonecrótica provocada pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Para isso, foram utilizados 159 camundongos Swiss, dispostos em 13 grupos de 12 animais cada, sendo que três animais foram utilizados para a determinação da dose dermonecrótica. A injeção via intramuscular de 250 µg de veneno de *B. jararaca* ou tampão fosfato-salino (grupo controle), foi realizada no músculo gastrocnêmico dos camundongos. O aparecimento da lesão foi acompanhado seis e 12 horas após a injeção, quando foram iniciados os tratamentos. O tratamento utilizado consistiu em diferentes combinações de nanopartículas de ouro, agentes eletrofísicos e soro antibotrópico. Foi analisada a atividade dermonecrótica no músculo gastrocnêmio e regiões adjacentes e, além disso, foi realizada análise histológica e determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, bem como avaliação de marcadores de danos oxidativos e defesas antioxidantes do músculo gastrocnêmio, rins e coração. As combinações terapêuticas envolvendo as nanopartículas de ouro e os agentes eletrofísicos demonstraram parâmetros positivos na cicatrização da lesão nas análises realizadas quando comparados ao tratamento padrão. Além disso, a associação desses tratamentos com o soro antibotrópico acelerou a recuperação da lesão, de acordo com os dados histológicos e bioquímicos, sugerindo que utilizá-los como coadjuvantes ao tratamento com o soro antiveneno pode melhorar o prognóstico das vítimas de envenenamento botrópico.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*; envenenamento; lesão; tratamento; fotobiomodulação; nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Accidents with venomous animals are a serious public health problem in Brazil. Snakes of the genus *Bothrops* are considered venomous and have venom that causes various pathophysiological changes, such as tissue damage, hemorrhage and necrosis. The treatment recommended by the Ministry of Health of Brazil for those who suffer accidents with snakes is serotherapy. *Bothrops* venom is rich in several components that are harmful to the victim's body, such as metalloproteinases, which affect and worsen the severity of the injury, and can cause serious consequences, such as amputation. Due to the severity of these injuries and the lack of specific treatment, there is a need for new therapies. Gold nanoparticles, ultrasound and laser have been used as modulators of the inflammatory response. Therefore, this work aimed to evaluate the use of gold nanoparticles and electrophysical agents for the treatment of dermonecrotic lesions caused by the venom of the *Bothrops jararaca* snake. For this, 159 Swiss mice were used, arranged in 13 groups of 12 animals each, with three animals being used to determine the dermonecrotic dose. Intramuscular injection of 250 µg of *B. jararaca* venom or phosphate-buffered saline (control group) was performed in the gastrocnemius muscle of the mice. The appearance of the lesion was monitored six and 12 hours after the injection, when treatments were started. The treatment used consisted of different combinations of gold nanoparticles, electrophysical agents and antiothropic serum. Dermonecrotic activity in the gastrocnemius muscle and adjacent regions was analyzed and, in addition, histological analysis and intracellular determination of reactive oxygen species and nitric oxide were performed, as well as evaluation of markers of oxidative damage and antioxidant defenses of the gastrocnemius muscle, kidneys and heart. Therapeutic combinations involving gold nanoparticles and electrophysical agents demonstrated positive parameters in wound healing in the analyzes carried out when compared to standard treatment. Furthermore, the association of these treatments with antiothropic serum accelerated the recovery of the lesion, according to histological and biochemical data, suggesting that using them as adjuvants to treatment with antivenom serum can improve the prognosis of victims of bothropic envenomation.

Keywords: *Bothrops jararaca*; envenomation; lesion; treatment; fotobiomodulation; gold nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa simplificado da América do Sul.....	18
Figura 2. Aspecto geral da serpente <i>B. jararaca</i> apresentando uma das colorações encontradas nessa espécie.....	19
Figura 3. Fotografia da dissecação superficial da perna e área poplítea mostrando uma visão posterior do tríceps sural e seus componentes e estruturas adjacentes.....	25
Figura 4. Fases do processo de dano e reparo do músculo esquelético.....	27
Figura 5. Desenho experimental.....	36
Figura 6. Imagens TEM (esquerda) e UV-Vís (direita) das GNPs.....	41
Figura 7. Evolução da dermonecrose no músculo gastrocnêmio.....	46
Figura 8. Análise histológica do músculo gastrocnêmio.....	47
Figura 9. Determinação de oxidantes: diclorofluoresceína (DCF) e nitrito (NO) no coração.....	50
Figura 10. Determinação de oxidantes: diclorofluoresceína (DCF) e nitrito (NO) nos rins.....	51
Figura 11. Determinação de oxidantes: diclorofluoresceína (DCF) e nitrito (NO) no músculo gastrocnêmio.....	51
Figura 12. Determinação do dano oxidativo no coração: carbonil e conteúdo de sulfidril.	52
Figura 13. Determinação do dano oxidativo nos rins: carbonil e conteúdo de sulfidril.	53
Figura 14. Determinação do dano oxidativo no músculo gastrocnêmio: carbonil e conteúdo de sulfidril.	54
Figura 15. Determinação de antioxidantes no coração: superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH).....	55
Figura 16. Determinação de antioxidantes nos rins: superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH).....	56
Figura 17. Determinação de antioxidantes no músculo gastrocnêmio: superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimento metodológicos.....	35
Tabela 2. Resumo dos resultados histológicos observados no músculo gastrocêmio.....	66
Tabela 3. Resumo dos resultados das análises bioquímicas de oxidantes, dano oxidativo e antioxidantes.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM's	Família de proteínas desintegrina e metaloproteinases, do inglês <i>A Desintegrin and Metalloprotease</i>
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
CEUA	Comissão Ética para Uso de Animais
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano, do inglês <i>Damage-associated molecular patterns</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico 2, do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GNPs	Nanopartículas de ouro
HIF-1 α	Fator 1 induzível por hipóxia 1 α , do inglês <i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1, do inglês <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
L	Laser
LAOO	L-aminácidos oxidados
MEC	Matriz extracelular
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>Nitric oxide</i>
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês <i>pattern recognition receptors</i>
SA	Soro antibotrópico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SS	Solução salina 0,9 %
SVMPs	Metaloproteinases do veneno da serpente, do inglês <i>Snake Venom Metalloproteinases</i>
TCI	Tecido conjuntivo intramuscular
TGF- α	Fator de transformação de crescimento α , do inglês <i>Growth Transformation Factor</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β , do inglês <i>Growth Transformation Factor β</i>
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante β 1, do inglês <i>Transforming Growth Factor β1</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α , do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
U	Ultrassom
VBj	Veneno <i>Bothrops jararaca</i>
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Acidentes com animais peçonhentos	17
1.2. Ofidismo: acidente botrópico.....	17
1.3. Veneno botrópico.....	21
1.4. Jararagina	22
1.5. Lesão Muscular e Cicatrização	24
1.6. Nanopartículas e eletroterapia.....	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Procedimentos éticos	33
3.2. Veneno	33
3.3. Animais	33
3.4. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro.....	33
3.5. Lesão dermonecrótica	34
3.5.1. Determinação da dose dermonecrótica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	34
3.5.2. Indução da lesão dermonecrótica.....	34
3.6. Tratamentos.....	35
3.7. Avaliação da atividade dermonecrótica	37
3.8. Eutanásia.....	37
3.9. Conteúdo de Proteínas	37
3.10. Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico ..	37
3.11. Marcadores de dano oxidativo	38
3.12. Defesas antioxidantes.....	39
3.13. Análise histológica.....	39
3.14. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Determinação da dose dermonecrótica	41
4.2. Síntese e caracterização das GNPs	41
4.3. Dermonecrose	42
4.4. Análise histológica.....	46

47

47

4.5.	Determinação de oxidantes, dano oxidativo e produção de antioxidantes	49
4.5.1.	Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico	49
4.5.2.	Determinação do dano oxidativo.....	52
4.5.2.1.	Determinação da produção de antioxidantes	55
4.	DISCUSSÃO	59
5.	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – Comissão de Ética no Uso de Animais	95
	APÊNDICE B – Comissão de Ética no Uso de Animais.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes com animais peçonhentos

Os acidentes causados por animais peçonhentos são responsáveis pelo grande número de morbimortalidade no mundo, especialmente em países tropicais, sendo considerados como um problema de saúde pública negligenciado devido à abrangência e à gravidade desses acidentes (Gutiérrez et al, 2006; Abreu et al, 2015).

No Brasil, somente em 2020, foram registrados mais de 254.000 acidentes ocasionados por animais peçonhentos¹. Anteriormente, em 2017, esses acidentes foram contabilizados em 221.336², demonstrando um aumento de casos no decorrer dos últimos três anos. São considerados como Doenças e Agravos de Notificação Compulsória no Brasil, divulgadas através do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) (Brasil, 2023).

A diversidade de habitat disponível no Brasil favorece a variedade de espécies de animais peçonhentos (Brasil, 2019) e dentre os de interesse médico estão as serpentes. Somente no Brasil existem 442 serpentes (Costa & Bérnils, 2018), sendo que 62 delas são consideradas peçonhentas (Bernarde, 2014) e 32 delas pertencem ao gênero *Bothrops*, da família Viperidae (Tokarnia & Peixoto, 2006).

1.2. Ofidismo: acidente botrópico

Os acidentes ofídicos estão entre os maiores causadores de envenenamentos por animais peçonhentos, perdendo apenas para os acidentes escorpiônicos. Os registros demonstram um aumento significativo desses acidentes nos últimos anos no Brasil. Estima-se que ocorram entre 1.8 e 2.7 milhões de acidentes ofídicos no mundo anualmente e entre 81 a 138.000 óbitos e três vezes mais amputações e outras complicações decorrentes do envenenamento (Silva et al, 2023; Salvador et al, 2019). Entretanto esses dados são questionáveis e subestimados, uma vez que alguns são coletados por meio de pesquisas domiciliares e não através de órgãos oficiais (Ferreira et al, 2020). Também deve ser considerado o difícil acesso das vítimas ao tratamento médico adequado e a cultura em optar por tratamentos caseiros. A maioria das vítimas pertence a faixa etária de 20 a 59 anos, com predominância do sexo masculino, especialmente moradores

¹ Dados atualizados em 15/01/2022, sujeitos à revisão.

² Dados atualizados em 27/01/2020.

de áreas rurais, acometidos geralmente nos membros inferiores (Abreu et al, 2015) (Brasil, 2021). Dos casos registrados em 2017, 28.500 acidentes foram ocasionados por serpentes, sendo o gênero *Bothrops* responsável por 20.134 casos³ (Brasil, 2023).

A espécie *Bothrops jararaca* é uma serpente de grande importância médica, pois está envolvida na maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no sudeste do Brasil (Kamiguti et al, 1991; Moura-da-Silva and Baldo 2012). Além disso, o gênero *Bothrops* é o mais prevalente na América do Sul e América Central, e particularmente a espécie *B. jararaca* destaca-se na América do Sul (GLOBAL SNAKEBITE INICIATIVE, 2020).



Figura 1. Mapa simplificado da América do Sul.

Possui dentes inoculadores, presas anteriores, com orifício central, pupilas em fenda, cabeça destacada do corpo e cauda afinada, lisa, sem chocalho e de coloração variada de acordo com seu habitat. Pode alcançar até 160 cm de comprimento (Figura 1) (Pinho and Pereira 2001). Possui hábitos noturnos e ataca diante de alguma ameaça, deferindo botes de maneira silenciosa (Brasil, 2001). São encontradas especialmente em ambientes rurais, locais com vegetação e na

³ Dados atualizados em 27/01/2020.

periferia das grandes cidades, preferindo locais úmidos e onde haja facilidade de reprodução de roedores, que consistem na base da sua alimentação (França et al, 2003).



Figura 2. Aspecto geral da serpente *B. jararaca* apresentando uma das colorações encontradas nessa espécie. Fotografia da serpente *Bothrops jararaca*. Fonte: Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, 2021.

O veneno da *B. jararaca* é composto por diversas moléculas responsáveis pela indução de alterações fisiopatológicas, a depender da quantidade de veneno inoculado (França et al, 2003), local da picada, tamanho da serpente, condição das glândulas e dos dentes da serpente, microflora da boca da serpente e da pele da vítima, idade, peso e estado de saúde da vítima e atividade realizada pela vítima após o acidente, uma vez que isso pode afetar a espalhabilidade do veneno (Adukauskiénė et al, 2011).

A profundidade da picada também é um fator fundamental que ditará a evolução da lesão. Caso a picada ocorra em regiões com maior quantidade de tecido adiposo, a lesão é mais branda quando comparada a regiões como face ou regiões altamente vascularizadas. Quando a picada é intradérmica, o veneno atinge os vasos linfáticos e vasos superficiais, podendo alcançar a circulação sistêmica. Nesse caso, ocorre necrose e aumento da permeabilidade capilar ocasionando a formação de edema local, pressão e isquemia dos tecidos que circundam a lesão, agravando o dano tecidual. Também ocorrem picadas intramusculares, desencadeando mionecrose, síndrome compartimental e isquemia. Acidentes com picadas intravasculares, geralmente na cabeça e pescoço, são mais perigosos, porém raros (Adukauskiénė et al, 2011).

O veneno da *B. jararaca* causa consequências graves locais e sistêmicas, como inflamação e dano tecidual, distúrbios hemostáticos, hemorragia, edema, mionecrose (Molina Molina et al, 2018) e dor (França et al, 2003). Em decorrência, podem surgir abscessos e o desenvolvimento de necrose. O óbito também é um desfecho possível e geralmente é atribuído aos efeitos sistêmicos do veneno, como a insuficiência renal, hemorragia e sepse (França et al, 2003).

Os efeitos locais são caracterizados por dor e edema precoces e progressivos, além de sangramentos e equimoses no local da picada, com ou sem necrose. As ações teciduais locais caracterizam-se pela formação de edema, bolhas e necrose, provavelmente decorrentes da ação proteolítica induzida por proteases, hialuronidases e fosfolipases presentes no veneno. Mediadores da resposta inflamatória, toxinas e fatores pró-coagulantes do veneno também podem estar envolvidos no dano local. Dentre as ações pró-coagulantes, estão as que ativam o fator X e a protrombina. Além disso, o veneno também mimetiza a ação da trombina, convertendo fibrinogênio em fibrina, acarretando incoagulabilidade sanguínea e podendo levar à plaquetopenia. Outra consequência importante do envenenamento é a hemorragia, causada por toxinas que lesionam a membrana basal dos capilares sanguíneos. (Amaral et al, 1986; Ministério da saúde do Brasil 2001; Pinho and Pereira 2001).

No que se refere à efeitos sistêmicos, destaca-se o alcance do potencial hemorrágico do veneno, que pode desencadear gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria. Ressalta-se ainda que pode ocorrer hemorragia uterina em gestantes. Podem ocorrer náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, mais raramente, choque. Diante da diversidade de sintomas, os quadros clínicos são classificados de acordo com a gravidade em leve, moderado e grave. O quadro leve é geralmente o mais comum e caracteriza-se por dor e edema local, com pouca ou nenhuma hemorragia e ausência de alterações no tempo de coagulação. O quadro grave é caracterizado por dor e edema além do local da picada, podendo ou não apresentar alterações hemorrágicas locais e sistêmicas. Abrange características como edema intenso e extenso, alcançando todo o membro onde ocorreu a picada. Apresenta dor intensa e em alguns casos, há a formação de bolhas. A isquemia também pode ser observada em decorrência do edema. Quando ocorrem manifestações sistêmicas como hipotensão arterial, choque, oligoanúria ou hemorragias intensas, o acidente é definido como grave independente da sintomatologia local (Ministério da saúde do Brasil, 2001).

As complicações locais dividem-se em síndrome compartimental, abscesso e necrose. A primeira ocorre devido ao extenso edema no membro atingido pela picada e causa isquemia

nas extremidades, levando à dor intensa, parestesia, diminuição da temperatura do segmento distal, cianose e déficit motor. É rara, ocorre em casos graves e o tratamento é complexo. O abscesso ocorre em aproximadamente 10 a 20% dos casos e decorre da ação proteolítica do veneno, mas também de microorganismos patogênicos presentes na boca do animal, na superfície da pele durante a picada ou de outros contaminantes depositados sobre o ferimento. E, por último, a necrose, causada também pela ação proteolítica do veneno associada à isquemia ocasionada pela lesão vascular, além de infecção, trombose arterial, síndrome compartimental não tratada e pelo uso inadequado de torniquetes. Neste caso o risco torna-se maior quando a vítima foi atingida nas extremidades, como os dedos, podendo evoluir para gangrena.

As complicações sistêmicas são o choque e a insuficiência renal aguda, ambos com patogênese multifatorial (Ministério da saúde do Brasil, 2001). Dentre os efeitos citados ocasionados pelo acidente ofídico, os mais comuns são distúrbios hemostáticos graves, coagulopatia, hemorragia local e sistêmica, além de danos locais (Kamiguti et al, 1991; Paine et al, 1992).

Diante da diversidade de sintomas, os quadros clínicos são classificados de acordo com a gravidade em leve, moderado e grave (Brasil, 2001). O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde consiste na administração do soro antiofídico (antiveneno específico) via intravenosa (Ministério da saúde do Brasil, 2001). Este soro consiste em uma mistura de imunoglobulinas ou anticorpos resultantes da sensibilização de animais (geralmente cavalos ou ovelhas) (Gutiérrez et al, 2006). O soro proporciona a neutralização do veneno circulante, evitando a evolução de efeitos sistêmicos (Silva et al, 2018). Assim, recomenda-se a administração do soro o mais rápido possível após o acidente para evitar a evolução do caso. Estudos demonstraram que a administração do soro 6 horas após a picada não impediu o aumento da severidade do envenenamento (Feitosa et al, 2015). Analgésicos e antibióticos também podem ser prescritos para proporcionar mais conforto ao paciente (Ministério da saúde do Brasil, 2001).

1.3. Veneno botrópico

Os venenos possuem ampla diversidade bioquímica, compreendendo proteínas enzimáticas e não enzimáticas, que facilitam a imobilização e digestão da presa, bem como a defesa contra predadores (Kang et al, 2011). Além disso, há especificidades relacionadas a cada

família, gênero e espécie, decorrente dos diferentes habitats proporcionados em regiões tropicais, como ocorre no Brasil (Gutiérrez et al, 2006; Bochner et al, 2014).

O veneno botrópico compreende diversas classes de toxinas, como as serina proteinases, lectinas do tipo C, fatores potencializadores de bradicinina, fosfolipases A2 (PLA₂), proteínas ricas em cisteína, L-aminoácidos oxidases (LAAO), fator de crescimento do endotélio vascular derivado do veneno de serpente (VEGF-A) e metaloproteinases do veneno da serpente (*Snake Venom Metalloproteinases* – SVMPs) (Moura-da-Silva et al, 2007). As SVMPs são consideradas as principais responsáveis pelo dano tecidual e pelas respostas inflamatórias induzidas pelas serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo o desenvolvimento de necrose, hemorragia e edema (Gutiérrez and Rucavado 2000).

As SVMPs são enzimas dependentes de zinco (Kang et al, 2011; Freitas-de-Sousa et al, 2017) encontradas em abundância no veneno, correspondendo a aproximadamente 30% do volume total de proteínas dos venenos de serpente da família Viparidae (Kang et al, 2011), e são as principais responsáveis pela hemorragia induzida pelo veneno (Freitas-de-Sousa et al, 2017; Moura-da-Silva et al, 2007), que ocorre através da hidrólise dos componentes da membrana basal das proteínas dos microvasos (Molina Molina et al, 2018; Cedro et al, 2018). Além da hemorragia, as SVMPs também são responsáveis por desregular a hemostasia ao induzir efeitos pró e anti-coagulantes, além de agregação plaquetária, apoptose e atividades pró-inflamatórias (Kang et al, 2011).

As SVMPs têm de 10 a 100 kDa e são classificadas em três grupos (P-I a P-III), de acordo com a organização dos seus domínios (Fox & Serrano, 2008, 2005). O grupo P-I contém o domínio metaloproteinase; o grupo P-II contém o domínio metaloproteinase e o domínio desintegrina; e o grupo P-III contém os domínios metaloproteinase, domínio tipo desintegrina e domínio rico em cisteína (Kang et al, 2011), assemelhando-se às proteínas da família desintegrina e metaloproteinases (*A Desintegrin and Metalloprotease* - ADAM's), proteínas transmembranares presentes nos mamíferos (Fox & Serrano, 2008).

1.4. Jararagina

A jararagina foi a primeira SVMP isolada do veneno da serpente *B. jararaca* (Paine et al, 1992) e possui similaridade com as ADAM's, que são proteínas de mamíferos que contêm domínios desintegrina, metaloproteinase e domínios ricos em cisteína (Seals & Courtneidge, 2003). As ADAM's estão envolvidas na comunicação e regulação da função celular (Fox &

Serrano, 2008), além de participarem do desenvolvimento de patologias como a inflamação e o câncer (Seals & Courtneidge, 2003).

Estudos demonstram importante envolvimento da jararagina em danos locais e sistêmicos durante o envenenamento (Moura-da-Silva and Baldo 2012). Esta enzima possui ampla participação nos efeitos do veneno da *B. jararaca*, uma vez que interfere na hemostasia (Laing & Moura-Da-Silva, 2005), ocasionando a proteólise dos componentes da matriz extracelular (MEC), das proteínas plasmáticas e das proteínas de superfície celular. Além disso, é responsável pela interação com os receptores das plaquetas, células endoteliais e fibroblastos, modificando a resposta celular (Gutiérrez et al, 2005; Moura-da-Silva et al, 2007; White 2005).

Desta forma, a jararagina contribui para os efeitos anticoagulantes ao clivar o fibrinogênio (Kamiguti et al, 1994) e degradar a fibrina (Baldo et al, 2008). Além disso, é capaz de inibir o colágeno e a agregação plaquetária induzida pela ristocetina (Kamiguti et al, 1996) e inibe a agregação plaquetária. O óbito também é um desfecho possível e geralmente é atribuído aos efeitos sistêmicos do veneno, como a insuficiência renal, hemorragia e sepse (França et al, 2003). Todos os efeitos citados contribuem para alterações patológicas como a hemorragia, miocrose e inflamação (Gutiérrez et al, 2005; Moura-da-Silva et al, 2007; White 2005).

A jararagina possui capacidade de ligar-se com alta afinidade ao colágeno tipo I, muito resistente e presente na pele e em tendões, e ao colágeno tipo IV, componente principal da membrana basal, que promove sustentação e funciona como uma barreira entre os compartimentos do tecido (Moura-da-Silva et al, 2008; Sand et al, 2019). Ela age sobre os receptores de integrina $\alpha 2\beta 1$ presentes na célula, clivando a subunidade $\beta 1$ do receptor de integrina, que por consequência modifica a estrutura conformacional da subunidade $\alpha 2$, responsável pelo reconhecimento do colágeno nativo. Essa ação impede que o colágeno da MEC se ligue à célula (Kamiguti et al, 1996), o que leva a apoptose das células endoteliais. Além disso, os mecanismos envolvidos na inibição da agregação plaquetária via colágeno incluem a competição da jararagina e do colágeno para se ligarem ao receptor $\alpha 2\beta 1$ (Tanjoni et al, 2010). Esse receptor é expresso principalmente em células epiteliais e nas plaquetas, sendo o principal regulador da migração celular (Luca et al, 1995). As células endoteliais também são muito investigadas, e são consideradas potenciais alvos dessas toxinas hemorrágicas. Em estudos *in vitro*, a jararagina demonstrou inibir a adesão de células endoteliais em placas de cultura revestidas com colágeno (Moura-da-Silva et al, 2001).

A jararagina provoca o recrutamento de células inflamatórias, como os neutrófilos (Clissa et al, 2006; Zuliani et al, 2020), a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1 β) *in vivo* (Clissa et al, 2006; Laing et al, 2003), além da expressão de mRNA de TNF- α e IL-1 β *in vitro* (Clissa et al, 2001). Os neutrófilos contribuem para a lesão da membrana muscular (Kudsi et al, 2020) e amplificam o processo inflamatório através da quimiotaxia de macrófagos (Tidball, 2005a). A infiltração de macrófagos aumenta a proporção do dano muscular devido inicialmente à produção de óxido nítrico (NO) (Tidball, 2011, 2005a; Kawanishi et al, 2016); e da secreção de citocinas pró-inflamatórias que promovem o recrutamento de células inflamatórias para o tecido danificado (Tidball, 2011). Essas citocinas liberadas durante o envenenamento explicam a hiperalgesia induzida pelo veneno da *B. jararaca* (Ferraz et al, 2015; Cunha et al, 1992).

1.5. Lesão Muscular e Cicatrização

O músculo esquelético representa o maior componente da composição corporal em humanos e influencia diretamente em diversos processos fisiológicos, como a manutenção da postura corporal, movimento articular, termogênese, metabolismo e secreção de peptídeos que são utilizados por outros tecidos (Kanazawa et al, 2023; Csapo et al, 2020). O músculo gastrocnêmio, localizado junto a um grupo muscular denominado tríceps sural – composto pelo músculo gastrocnêmio, sóleo e plantar –, possui importante função relacionada à manutenção de postura e marcha. É um músculo complexo, cuja funcionalidade afeta todo o membro inferior, bem como o movimento do quadril e da região lombar. Compreende duas cabeças, uma medial e uma lateral, que se inserem na região pósterio-superior do côndilo femoral correspondente (Figura 3) (Dalmau-Pastor et al, 2014).

A cabeça medial do músculo gastrocnêmio origina-se na epífase distal do fêmur, possuindo duas origens, uma medial e uma lateral. A origem medial consiste em um tendão achatado e resistente, que se estende sobre o côndilo medial, abaixo da inserção do tendão do músculo adutor magno e ao longo da crista supracondilar medial. Já a origem lateral do músculo gastrocnêmio ocorre por meio de fibras tendinosas e musculares curtas na face poplíteia do côndilo femoral medial, onde há uma eminência conhecida como tubérculo supracondilóide medial, e na cápsula da articulação do joelho. A cabeça lateral do músculo gastrocnêmio tem sua origem a partir das superfícies laterais do epicôndilo, proximal ao tendão do músculo poplíteo, fixando-se na crista supracondilar lateral. As fibras tendinosas e musculares originam-

se na cápsula articular do joelho e de um tubérculo supracondilar lateral (Dalmau-Pastor et al, 2014).

As cabeças medial e lateral direcionam-se para baixo, delimitando a fossa poplíteia, unindo-se aproximadamente no terço médio da perna para formar uma aponeurose que cobre toda a zona anterior dos corpos musculares. Essa aponeurose une-se com a lâmina tendinosa do sóleo para formar o tendão calcâneo. O local onde ocorre essa união desempenha um papel fundamental na anatomia do músculo gastrocnêmio (Dalmau-Pastor et al, 2014).

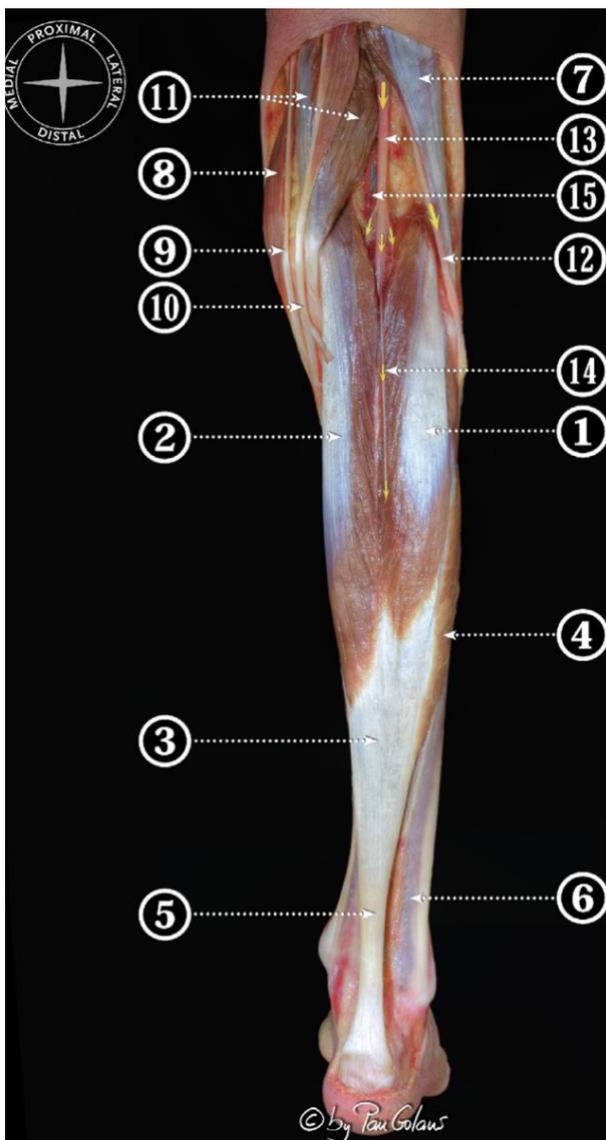


Figura 3. Fotografia da dissecação superficial da perna e área poplíteia mostrando uma visão posterior do tríceps sural e seus componentes e estruturas adjacentes. 1, cabeça lateral do músculo gastrocnêmio; 2, cabeça medial do músculo gastrocnêmio; 3, aponeurose do gastrocnêmio; 4, músculo sóleo; 5, tendão calcâneo; 6, fásia profunda posterior da perna; 7, músculo bíceps femoral; 8, músculo sartório; 9, tendão grácil; 10, tendão semitendíneo; 11, músculo semimembranoso; 12, nervo fibular comum; 13, nervo tibial e ramos; 14, nervo sural; 15, artéria e veia poplíteia (Dalmau-Pastor et al., 2014; Pau Golanó, 2014).

A tensão do músculo gastrocnêmio pode impactar não somente a região onde está o músculo, mas também o pé, joelho, quadril e lombar. Uma alteração no músculo gastrocnêmio pode causar disfunções nos movimentos fisiológicos do quadril, reduzindo sua anteversão (Cruz-Montecinos et al, 2015). A disfunção do músculo gastrocnêmio também pode afetar a fáscia plantar, prejudicando a sustentação fisiológica do pé (Pascual Huerta, 2014).

O refluxo venoso dos membros inferiores para o coração deve superar as forças gravitacionais da posição vertical. Esse sistema envolve uma interação complexa dos músculos da panturrilha – composto pelo grupo muscular tríceps sural –, válvulas venosas e veias perfurantes. A pressão desencadeada pela contração da panturrilha é a força primária para o retorno venoso contra a gravidade, elevando a pressão do compartimento venoso profundo e impulsionando o sangue venoso para as veias poplítea e femoral. Quando há o relaxamento muscular, o gradiente de pressão é revertido e ocorre o refluxo fisiológico. A veia poplítea, formada pela junção da veia safena e veias tibiais, é responsável por drenar o sangue venoso do músculo gastrocnêmio. Ascendendo, a veia poplítea passa pela abertura do adutor para se tornar a veia femoral. As veias que influenciam o fluxo sanguíneo quando ocorre a contração da panturrilha são chamadas de veias de Cockett (Baliyan et al, 2016).

A MEC dos músculos esqueléticos é um sistema complexo composto de colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos e elastina. Os fibroblastos são as células responsáveis pela produção de proteínas que compõem a MEC, incluindo o colágeno. Os diferentes tipos de colágeno formam o que se denomina rede de tecido conjuntivo intramuscular (TCI). Essa rede é definida como uma junção de três camadas compostas pelo endomísio, envolvendo as fibras musculares individuais; grupos de fibras musculares do perimísio; e epimísio, envolvendo todas as fibras musculares. Sugere-se ainda que o TCI pode ser mais detalhado que o supracitado. Estudos indicam que o TCI é um sistema complexo que se interconecta com todos os órgãos, músculos, ossos e fibras nervosas (Zügel et al, 2018; Stecco et al, n.d.; Gillies & Lieber, 2011; Csapo et al, 2020; Adstrum et al, 2017).

O TCI é composto por vários tipos de colágeno, sendo que os tipos I e III são os mais abundantes, compreendendo 75% do colágeno muscular total. Esses tipos de colágeno, denominados colágenos fibrosos, estão localizados no epimísio, perimísio e no endomísio (McKee et al, 2019; Light & Champion, 1984; Gillies & Lieber, 2011; Duance et al, 1977). Os colágenos não fibrosos, como o colágeno tipo IV e VI, localizam-se na MB (Urciuolo et al, 2013; Sanes, 2003).

Quando há uma lesão muscular, ocorre uma série de respostas imunes para eliminar os tecidos danificados e os possíveis agentes infecciosos envolvidos, que levam à destruição tecidual e à reconstrução. Essa reação em defesa do hospedeiro é natural, mas quando descontrolada pode ocasionar danos aos tecidos. Baseado em eventos celulares e moleculares, são descritas cinco fases inter-relacionadas: degeneração necrótica, inflamação, regeneração, maturação/remodelação e recuperação funcional (Figura 4). A degeneração necrótica caracteriza-se pela perda da integridade das miofibras e de outras células, prejudicando a permeabilidade adequada da membrana plasmática, levando a alterações no fluxo iônico e perda da arquitetura celular adequada (Forcina et al, 2020).

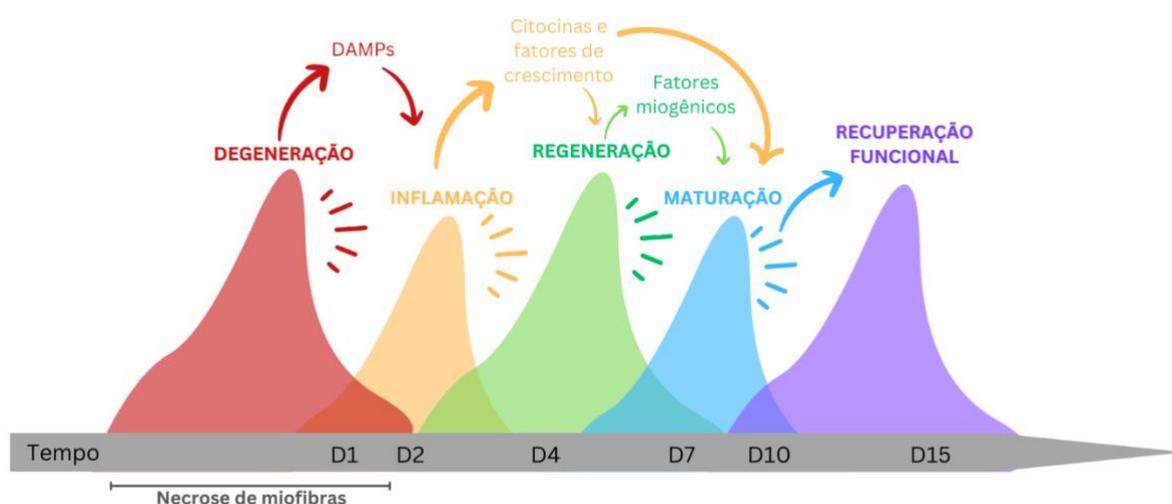


Figura 4. Fases do processo de dano e reparo do músculo esquelético. As ondas coloridas representam os cinco estágios do processo: degeneração necrótica, inflamação, regeneração, maturação/remodelação e recuperação funcional. D = dia; DAMPs: padrões moleculares associados ao dano. Adaptado de (Forcina et al., 2020).

A inflamação resultante de trauma ou ocasionada por agentes infecciosos é marcada pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos, além da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) (Eltzschig & Eckle, 2011; Chen & Nuñez, 2010). Além disso, também se destacam os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são liberados das células danificadas em resposta ao dano. Os DAMPs podem ser reconhecidos pela imunidade inata e são considerados os principais indutores da inflamação após o dano tecidual. Durante a lesão, os DAMPs podem ser liberados no ambiente extracelular e na circulação sanguínea, sendo reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os DAMPs liberados no espaço intersticial e na circulação sistêmica interagem com os PRRs promovendo a inflamação (Zindel & Kubes, 2019; Zhang & Mosser, 2008; Roh & Sohn, 2018; Gong et al, 2020).

As quimiocinas ativam a migração de leucócitos a partir da corrente sanguínea, direcionando-se para o espaço intersticial. Após o recrutamento dos primeiros leucócitos, inicia-se a ativação e a migração de neutrófilos e monócitos para o local da lesão. No local da lesão, as células do sistema imune reagem aos DAMPs e produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , aminas vasoativas, NO, espécies reativas de oxigênio (ERO), neuropeptídeos e metabólitos do ácido araquidônico, que promovem respostas inflamatórias por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos (Wynn et al, 2013; Uderhardt et al, 2019; Tu & Li, 2023; He et al, 2019; Frangogiannis et al, 1998; Enoksson et al, 2011; Davies & Taylor, 2015).

O sistema complemento também está fortemente envolvido na lesão muscular, uma vez que os músculos esqueléticos são responsáveis por produzir alguns dos componentes envolvidos nesse sistema. No início da lesão muscular, o sistema complemento é ativado pelos seus contatos com componentes intracelulares teciduais. Após a ativação, ocorre o recrutamento de células imunológicas para causar a inflamação. Quando ocorre a inibição dessa ativação, a migração de neutrófilos no músculo esquelético é atenuada e, conseqüentemente, ocorre a melhora do processo inflamatório (Tu & Li, 2023; Rô Me Frenette et al, n.d.; Legoedec et al, 1997; Han et al, 2010; Dufaux & Order, 1989).

O processo inflamatório promove a regeneração muscular através da miogênese com a ativação células-tronco satélites desencadeada por fatores derivados de miofibras danificadas. Essas células podem proliferar e se diferenciar, se fundindo com as fibras danificadas, reconstruindo a fibra muscular. As miofibras necróticas, encontradas após a lesão muscular, impedem a fusão dos mioblastos. Os macrófagos pró-inflamatórios (fenótipo M1) infiltrados na lesão digerem as células mortas via fagocitose, acarretando uma mudança fenotípica que os torna macrófagos anti-inflamatórios (fenótipo M2), auxiliando na regulação da inflamação, fusão e crescimento de mioblastos, fibrose, angiogênese e promoção da homeostase. Quando há uma infiltração insuficiente de macrófagos ou pouca fagocitose das fibras necróticas, ocorre prejuízo da miogênese, sendo, portanto, importante que este processo aconteça de forma regulada a fim de promover uma regeneração muscular eficaz. Essa etapa marca o final do processo pró-inflamatório e o início da fase de regeneração muscular esquelética (Watanabe et al, 2019; Tu & Li, 2023; Sciorati et al, 2016; Juban & Chazaud, 2021; Dort et al, 2019).

A fase de regeneração muscular é estimulada por citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e TGF β , liberadas pelas células imunológicas e por fatores de crescimento. Essas citocinas agem estimulando a expansão das células estaminais musculares, promovendo o reparo muscular. Os

mastócitos no local da lesão também estão associados ao reparo muscular através da arteriogênese e da formação de circulação no músculo esquelético após lesão isquêmica. Portanto, a ativação dos mastócitos está relacionada com o aumento da neovascularização, contribuindo fortemente para o remodelamento vascular (Tu & Li, 2023; Chillo et al, 2016; Bot et al, 2020).

Na fase de remodelação, é necessário o início da reconstituição do músculo e de todas as interconexões executadas por ele, como a MEC, os vasos sanguíneos e as fibras nervosas. No trauma e durante as fases necrótica e inflamatória, todos esses componentes sofrem um extenso dano. O início dessa fase se dá com a deposição da MEC dentro de uma semana após a lesão. Esse processo se inicia a partir da atividade dos fibroblastos em resposta aos mediadores inflamatórios como o TGF- β 1. A MEC é a base para guiar a formação de novas miofibras e junções neuromusculares, sendo, portanto, uma importante etapa para o sucesso da regeneração muscular. Nessa fase ocorre também a angiogênese, restaurando a circulação local funcional para o músculo (Musarò, 2014; Mann et al, 2011; Forcina et al, 2020).

Por último, ocorre a reinervação e a recuperação funcional do músculo, quando o processo de cicatrização é concluído e as miofibras regeneradas recuperam seu desempenho. Nessa etapa, os músculos só serão efetivamente funcionais se recuperarem a sua inervação. Nesse sentido, as células satélites têm fundamental importância no controle da inervação das miofibras (Forcina et al, 2020).

A resposta inflamatória age frente à lesão muscular para promover a reparação ou no desencadeamento de um ciclo vicioso que pode agravar o dano tecidual (Yang & Hu, 2018; Roh & Sohn, 2018; Pierce & Pittet, 2014). Associando a necrose muscular devido ao dano à inflamação exacerbada, ocorre um acúmulo de um grande volume de líquido que aumenta a pressão intracompartimental no membro lesionado, aumentando a necrose e podendo levar à amputação do membro (Tu & Li, 2023). Os macrófagos de fenótipo M2 podem agir suprimindo a inflamação, evitando a cascata de quimiocinas e reduzindo a migração de neutrófilos (Wynn et al, 2013; Uderhardt et al, 2019). Portanto, estratégias que modulam a inflamação são consideradas essenciais no processo de reparo muscular. Todas as etapas precisam acontecer de forma coordenada e reguladas, com o objetivo de promover o sucesso da regeneração e do reparo muscular (Tu & Li, 2023; Forcina et al, 2020).

1.6. Nanopartículas e eletroterapia

As nanopartículas de ouro (GNPs) têm sido utilizadas frequentemente em diferentes áreas biomédicas, contribuindo para o avanço da qualidade de tratamentos e diagnósticos. São utilizadas como biocarreadoras de fármacos devido à sua permeabilidade sobre as membranas celulares, bem como pela sua facilidade de distribuição no organismo (Ghosh et al, 2008; Arunachalam et al, 2014). Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que as GNPs possuem propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (Shah et al, 2014; Haupenthal et al, 2019; da Rocha et al, 2019; Arunachalam et al, 2014) e são capazes de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuir o dano oxidativo em diferentes modelos animais (Sul et al, 2010; Haupenthal et al, 2019; BarathManiKanth et al, 2010). Também já foi demonstrado que as GNPs podem interagir com IL-1 β extracelular e impedir a cascata de sinalização inflamatória em um modelo de artrite (Sumbayev et al, 2013).

Assim como a aplicação de nanopartículas se demonstra promissora na resolução da inflamação, a utilização de agentes eletrofísicos tem demonstrado eficácia na modulação de diferentes processos inflamatórios (da Rocha et al, 2019). Dentre eles está o laser, recurso bastante utilizado no tratamento de diversas patologias, incluindo a cicatrização de feridas. O uso do laser pode acelerar o processo cicatricial, evitando consequências piores para os acometidos por lesões teciduais (Ribeiro et al, 2004). A regeneração muscular pode ocorrer a partir da ativação das células satélite, que naturalmente são quiescentes, mas podem ser ativadas diante de um trauma, desencadeando a formação de novas miofibras. O laser pode agir sobre as miofibras, induzindo a sua formação através da modulação de processos biológicos fundamentais como o aumento da respiração mitocondrial e da síntese de adenosina trifosfato (ATP), que por consequência favorecem e aceleram a cicatrização tecidual (Shefer et al, 2003).

O ultrassom pulsado também é considerado recurso auxiliar no tratamento de diferentes tipos de lesões. Seu mecanismo de ação ocorre através da cavitação, do estímulo do transporte de drogas para os tecidos mais profundos e pelo aumento da permeabilidade das membranas plasmáticas. Este recurso é muito utilizado no tratamento de lesões musculares (Wilkin et al, 2004; Robertson & Baker, 2001). Também já foi relatado que o ultrassom pode estimular a diminuição do tamanho de feridas, angiogênese e aumento do número de fibroblastos nas lesões (Park et al, 2013; Fantinati et al, 2016).

Sendo assim, percebe-se que o uso de nanopartículas de ouro, ultrassom e laser pode ser eficaz no tratamento da dermonecrose provocada pelo veneno da serpente *B. jararaca*, uma vez que o veneno dessas serpentes possui baixo potencial imunogênico, e, conseqüentemente, um fraco poder de neutralização do veneno pelo soro antiveneno específico (Aguilar et al, 2020).

Além disso, os componentes do veneno agem rapidamente, reduzindo a eficácia do soro (Gutiérrez et al, 1998; Lomonte et al, 2003; Otero et al, 2002; Salvador et al, 2019). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de um tratamento seguro e eficaz, visando a recuperação da área afetada, evitando consequências graves às vítimas do envenenamento. Diante da gravidade do desenvolvimento das lesões provocadas pelo acidente botrópico, bem como do número crescente desses acidentes, um tratamento adequado proporcionaria a resolução de um problema de saúde pública negligenciado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o uso de nanopartículas de ouro e agentes eletrofísicos aplicados como tratamento da lesão dermonecrótica provocada pelo veneno da serpente *B. jararaca* em camundongos Swiss.

2.2. Objetivos específicos

- I. Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de ouro de 20 nm;
- II. Determinar a dose dermonecrótica do veneno de *B. jararaca* em camundongos Swiss;
- III. Induzir a lesão dermonecrótica em camundongos Swiss com a injeção do veneno da serpente *B. jararaca* no músculo gastrocnêmio da pata traseira direita;
- IV. Tratar as lesões formadas com diferentes combinações terapêuticas envolvendo soro antibotrópico, nanopartículas de ouro, ultrassom e laser;
- V. Avaliar as atividades dermonecrótica e hemorrágica nos camundongos durante e após os tratamentos;
- VI. Avaliar os efeitos das diferentes combinações terapêuticas sobre o infiltrado inflamatório, angiogênese, produção de colágeno e proliferação de fibroblastos através de análise histológica;
- VII. Avaliar os efeitos das diferentes combinações terapêuticas sobre a produção de oxidantes, dano oxidativo e sistema antioxidante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedimentos éticos

Este projeto foi submetido à Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob protocolo nº 77/2020 (APÊNDICE A e B), tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

3.2. Veneno

As amostras de veneno de *B. jararaca* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Carlos Chávez Olórtegui do Instituto de Ciência Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras liofilizadas foram estocadas a uma temperatura de -20 °C no escuro, até o seu uso.

3.3. Animais

Foram utilizados 159 camundongos Swiss pesando cerca de 20 g, dispostos em 13 grupos diferentes, cada grupo contendo 12 animais, incluindo tratamentos e os controles positivo e negativo, sendo que 3 animais foram utilizados para a determinação da dose dermonecrótica. Os camundongos foram mantidos no Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (Comprimento 30 cm x Largura 20 cm x Altura 13 cm), distribuídos em seis animais por caixa, colocados sobre estantes e sob os cuidados dos funcionários do Centro de Experimentação Animal. A temperatura do ambiente foi controlada entre 20 ±22 °C, ciclo claro-escuro 12/12h. Todos os animais receberão água e comida *ad libitum* em um ambiente com condições controladas.

3.4. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

Para a síntese das nanopartículas de ouro de 20 nm, foi utilizado o método descrito por (Turkevich et al, 1951), com pequenas modificações. A síntese ocorreu através da reação

química de redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) pelo citrato de sódio em meio aquoso. Primeiramente, 35 µL de HAuCl₄ foram diluídos em 100 mL de água e colocados em aquecimento até a temperatura de 95 °C. Após atingir essa temperatura, 5 mL de citrato de sódio foi adicionado gota a gota para se iniciar a reação. A solução foi então resfriada e caracterizada. A formação das GNPs foi determinada por análise de espectrofotometria UV-Vis (espectrofotômetro Shimadzu, UV 1800), sendo utilizada a região visível (400 nm – 700 nm) para avaliação. Para a determinação da concentração de GNPs na solução final, foi utilizado espectrometria de absorção atômica (The Agilent 720 ICP-OES, Santa Clara, CA, USA). A morfologia e o tamanho médio das GNPs foram determinados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Microscópio JEM-1011 (100 kV)). Para as análises de MET, uma gota da solução de GNPs foi adicionada a uma grid de cobre (malha 300) coberta com uma fina camada de carbono. O grid foi seco em temperatura ambiente (24h) para posterior obtenção das imagens.

3.5. Lesão dermonecrótica

3.5.1. Determinação da dose dermonecrótica do veneno de *B. jararaca*

A dose dermonecrótica do veneno de *B. jararaca* foi previamente determinada através da injeção do veneno diluído em tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) no músculo gastrocnêmio da pata traseira direita de 3 camundongos Swiss. Para a determinação da dose ideal, foi realizado o acompanhamento do tempo de desenvolvimento da lesão dermonecrótica objetivando-se a ausência da evolução para a morte anterior a sete dias, com o objetivo de mimetizar as situações comumente observadas em acidentes botrópicos que recebem atendimento médico.

3.5.2. Indução da lesão dermonecrótica

Para a indução da lesão foi utilizado o método proposto por (Costal-Oliveira et al, 2019). Primeiramente os animais foram depilados com lâminas na região da indução da dermonecrose e na região adjacente para melhor visualização da derme. A indução dermonecrótica ocorreu através da administração intramuscular de 250 µg de veneno de *B. jararaca* diluído em PBS aplicado no músculo gastrocnêmio da pata traseira direita dos camundongos, mimetizando a

região anatômica mais acometida nas vítimas por envenenamento botrópico. Para o grupo controle foi utilizado PBS aplicado na mesma região. Foi utilizado um volume de 100 µL de solução de veneno ou PBS por camundongo.

3.6. Tratamentos

Para avaliar a ação isolada e conjunta dos agentes eletrofísicos e das GNPs sobre a lesão dermonecrotica, foram utilizados diferentes esquemas de tratamentos nos animais. O soro antibotrópico também foi incorporado nos esquemas terapêuticos, pois é comum que se utilize este medicamento nos pacientes que sofrem acidentes com o veneno botrópico. Os tratamentos foram iniciados 12 horas após a injeção do veneno no músculo gastrocnêmio dos animais, sendo realizados uma vez ao dia, com duração de 7 dias consecutivos. Para fins de comparação e controle do experimento, um grupo de animais não recebeu injeção de veneno, injetando-se apenas PBS (controle negativo) e um grupo não recebeu nenhum tipo de tratamento após a injeção do veneno (controle positivo). Todos os outros grupos receberam algum tipo de tratamento, como demonstrado na tabela a seguir:

Tabela 3. Procedimento metodológicos.

Grupos (12 animais/grupo)	Injeção no músculo gastrocnêmio	Tratamento farmacológico	Tratamento por agentes eletrofísicos
1	Sol. salina	-	-
2	Veneno <i>B. jararaca</i>	-	-
3	Veneno <i>B. jararaca</i>	Soro antibotrópico	-
4	Veneno <i>B. jararaca</i>	Soro antibotrópico	Ultrassom
5	Veneno <i>B. jararaca</i>	Soro antibotrópico	Laser
6	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs + soro antibotrópico	-
7	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs + soro antibotrópico	Ultrassom
8	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs + soro antibotrópico	Laser
9	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs	-
10	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs	Ultrassom
11	Veneno <i>B. jararaca</i>	GNPs	Laser
12	Veneno <i>B. jararaca</i>	-	Ultrassom
13	Veneno <i>B. jararaca</i>	-	Laser

O soro antibotrópico foi administrado via intravenosa caudal; as nanopartículas e os tratamentos com agentes eletrofísicos foram administrados de forma tópica sobre a lesão dermonecrotica; os tratamentos foram administrados diariamente, com exceção do soro antibotrópico que foi administrado apenas no primeiro dia. GNPs: nanopartículas de ouro. Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

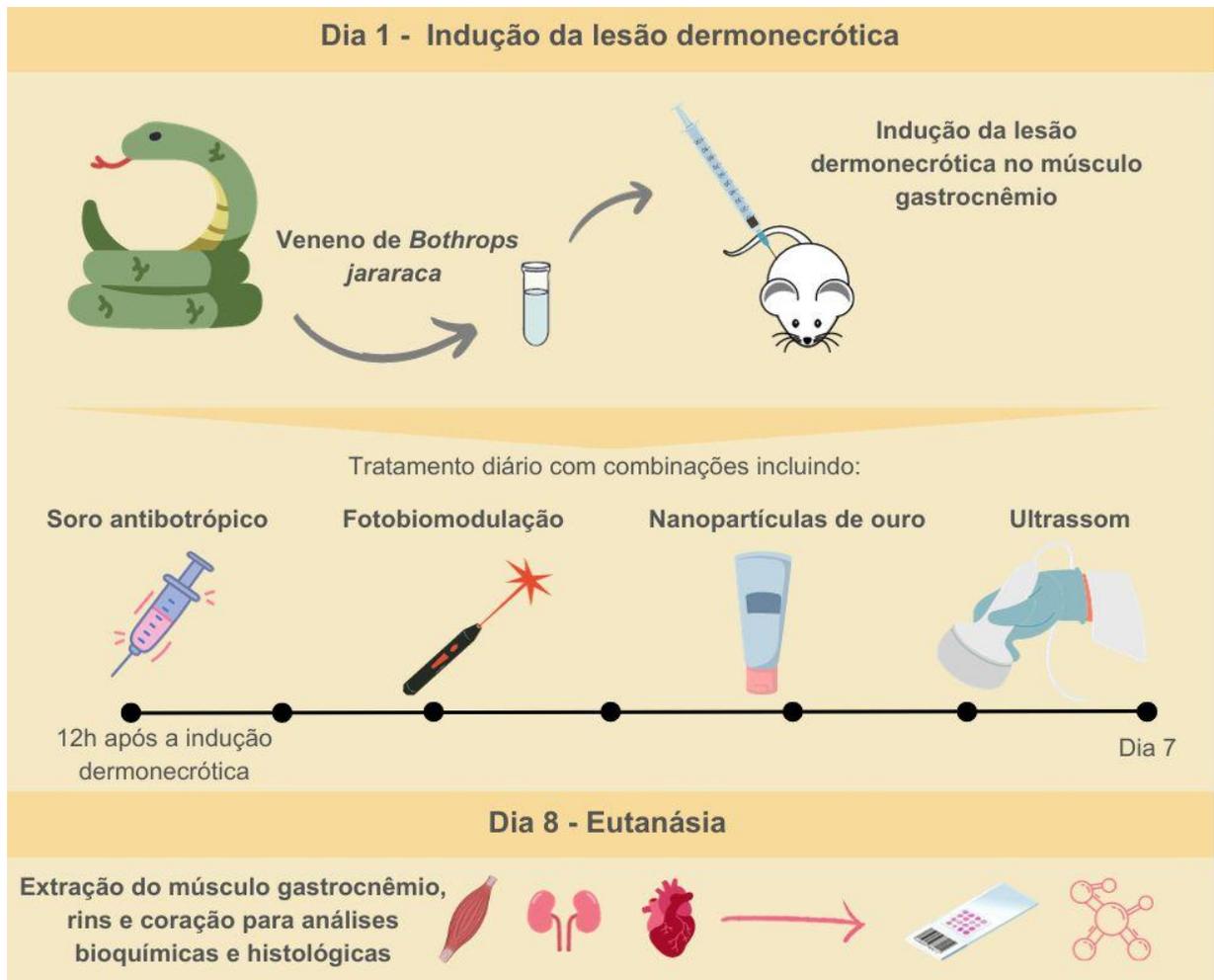


Figura 5. Desenho experimental. Desenho experimental demonstrando os procedimentos realizados para a indução da lesão dermonecrótica e aplicação dos tratamentos, bem como a extração dos órgãos após a eutanásia e as análises realizadas. Fonte: Elaborada pela autora.

Os animais receberam o tratamento com laser através da utilização do laser de baixa potência de Alumínio Gálio Índio Fósforo (AlGaInP) (Laerpulse – Ibramed) com comprimento de onda de 660 nm, aplicação pontual, feixe não visível, 2 J, durante um minuto por ponto. A aplicação foi realizada de forma pontual sem contato (distância aproximada de 1 mm), mantendo a caneta perpendicular à lesão, em cinco pontos, com distância de 0,5 cm entre os pontos. A irradiação foi realizada em volta e acima de toda a extensão da dermonecrose. Para o tratamento com ultrassom, foi utilizado o aparelho Brand Ibramed com 1 MHz de potência, intensidade 0,8 W/cm² e com 5 minutos de duração. A área em volta da lesão foi tratada com movimentos circulares. Como meio de condução do ultrassom, foi aplicado na área de tratamento gel salina. Nos grupos de tratamento com soro antibiótico, o soro foi aplicado numa concentração de 4% diluído em solução salina 0,9%, totalizando 100 µl/camundongo via

intravenosa caudal apenas no primeiro dia de tratamento. Os grupos tratados com nanopartículas de ouro receberam o tratamento através da aplicação de 1 mL de nanopartículas de ouro de 20 nm (30 mg/L) diluídas em gel salina aplicados topicamente em cima da lesão dermonecrótica.

3.7. Avaliação da atividade dermonecrótica

A avaliação da atividade dermonecrótica foi conforme proposto por (Costal-Oliveira et al, 2019). Foi utilizada uma régua milimetrada para avaliar a área de extensão da dermonecrose. As medidas foram realizadas em luz e posição padronizadas, antes do início do protocolo de tratamento (medidas basais) e todos os dias antes da aplicação dos tratamentos nos camundongos, bem como no dia da eutanásia, gerando um total de 8 medidas por camundongo.

3.8. Eutanásia

Doze horas após o último dia de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano 4% para coleta do sangue periférico e realização da eutanásia por método químico utilizando tiopental (50 mg/kg/mL, via intraperitoneal). O músculo gastrocnêmio foi seccionado e distribuído para as análises histológicas e bioquímicas. O coração e os rins, os principais órgãos acometidos pelos efeitos sistêmicos do envenenamento, foram coletados para as análises bioquímicas.

3.9. Conteúdo de Proteínas

O teor de proteína a partir do homogenado de tecido foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com (Lowry et al, 1951). O reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin-fenol) foi adicionado para se ligar à proteína e a absorbância foi lida a 640 nm em espectrofotômetro (Spectramax M3).

3.10. Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico

3.10.1. Diclorofluoresceína - DCFH-DA

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por EROs. As amostras foram incubadas com 10 mM de DCFH-DA a 37 °C por 30 minutos. A formação do produto fluorescente oxidado foi monitorada em espectrofotômetro de fluorescência (Spectramax M3) utilizando comprimento de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão). Uma curva padrão de DCF foi mensurada utilizando 10 nM de DCF para controle interno e quantificação das amostras. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência (Dong et al, 2010).

3.10.2. Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada por espectrofotometria através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente GRIESS (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthylethylenodiamina) em temperatura ambiente (22 a 24 °C) por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M3). O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO_2). Os resultados foram calculados em μmol nitrito/mg proteína (Chae et al, 2004).

3.11. Marcadores de dano oxidativo

3.11.1. Conteúdo de Sulfidril

Para determinar grupamentos tióis totais, foi utilizado o reagente de cor 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), que reduz os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), que foi mensurado por espectrofotometria (SpectraMax M3), onde a leitura foi realizada a 412 nm (Aksenov et al, 2001).

3.11.2. Carbonilação de Proteínas

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação causou a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado

via espectrofotometria (SpectraMax M3) a 370 nm, como previamente descrito por (Levine et al, 1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de $22.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.12. Defesas antioxidantes

3.12.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de (Bannister & Calabrese, 1987). As amostras de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 uL de amostra foram utilizados e 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), 175 a 185 mL de tampão de glicina (0,75g em 200 mL de água destilada a 32°C, pH 10,2), e 5 uL de adrenalina (60mM em água destilada +15 mL / mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180 segundos em intervalos de 10 segundos e medidos por espectrofotometria (SpectraMax M3) a 480 nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U SOD/mg de proteína).

3.12.2. Glutathione (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por (Hissin, 1967), com algumas adaptações. O GSH foi mensurado no homogenado de tecido epitelial após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. A absorbância foi lida a 412 nm por espectrofotometria (SpectraMax M3) depois de 10 minutos. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi utilizada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.13. Análise histológica

Sete dias após a indução da lesão dermonecrotica, os animais foram eutanasiados e tiveram o músculo gastrocnêmio da pata direita traseira removidos e pós-fixados em uma solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Em seguida, as amostras foram embebidas em parafina após desidratação e diafanização, e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura. As análises histológicas do infiltrado inflamatório foram realizadas

com hematoxilina-eosina (HE) e para análise do depósito e colágeno por *luxolfast blue* (LFB), respectivamente. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, sendo que quatro campos oculares por corte foram capturados. As imagens foram registradas com auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear das células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (DO).

3.14. Análise estatística

Os dados foram expressos através da média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, com *post hoc* de Bonferroni ou Dunnet. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos foi de no mínimo $p < 0,05$. Foi utilizado o *software GraphPad Prism 8.0.1*.

4. RESULTADOS

Para facilitar a leitura, os grupos tiveram a nomenclatura resumida e cada tratamento foi abreviado, quando conveniente, da seguinte forma: VBj (veneno *B. jararaca*), SS (solução salina 0,9%), SA (soro antibotrópico), GNPs (nanopartículas de ouro), L (Laser) e U (ultrassom).

4.1. Determinação da dose dermonecrótica

A determinação da dose dermonecrótica foi realizada utilizando 3 camundongos Swiss. Cada camundongo foi submetido a uma dose e teve a evolução da dermonecrose acompanhada nos dias seguintes. Foram testadas as seguintes doses definidas a partir da literatura: 150, 200 e 250 μg de veneno (diluído em PBS) de *B. jararaca* / camundongo. A dose que causou desmonecrose sem levar ao óbito foi a dose escolhida para a indução da lesão dermonecrótica, correspondente a 250 μg de veneno de *B. jararaca* / camundongo.

4.2. Síntese e caracterização das GNPs

As GNPs foram corretamente sintetizadas, apresentando coloração roxa. As GNPs apresentaram tamanho médio entre 20 e 30 nm e morfologia esférica. A análise UV-Vis demonstrou picos de absorção máxima em 523 nm, características de GNPs com tamanho médio de 20 nm (Figura 6) (Toma & Bonifácio, 2005; Haupenthal et al, 2019), corroborando com as imagens obtidas através da MET.

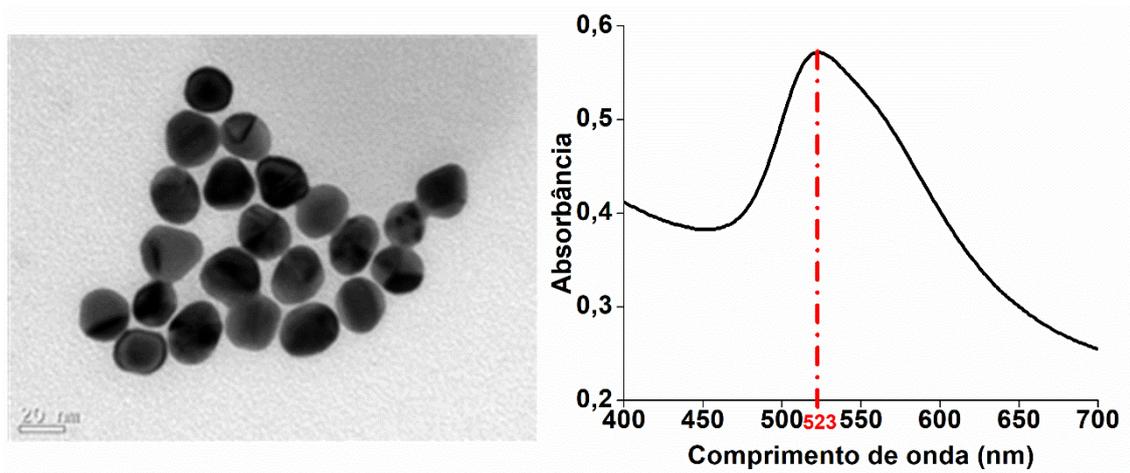
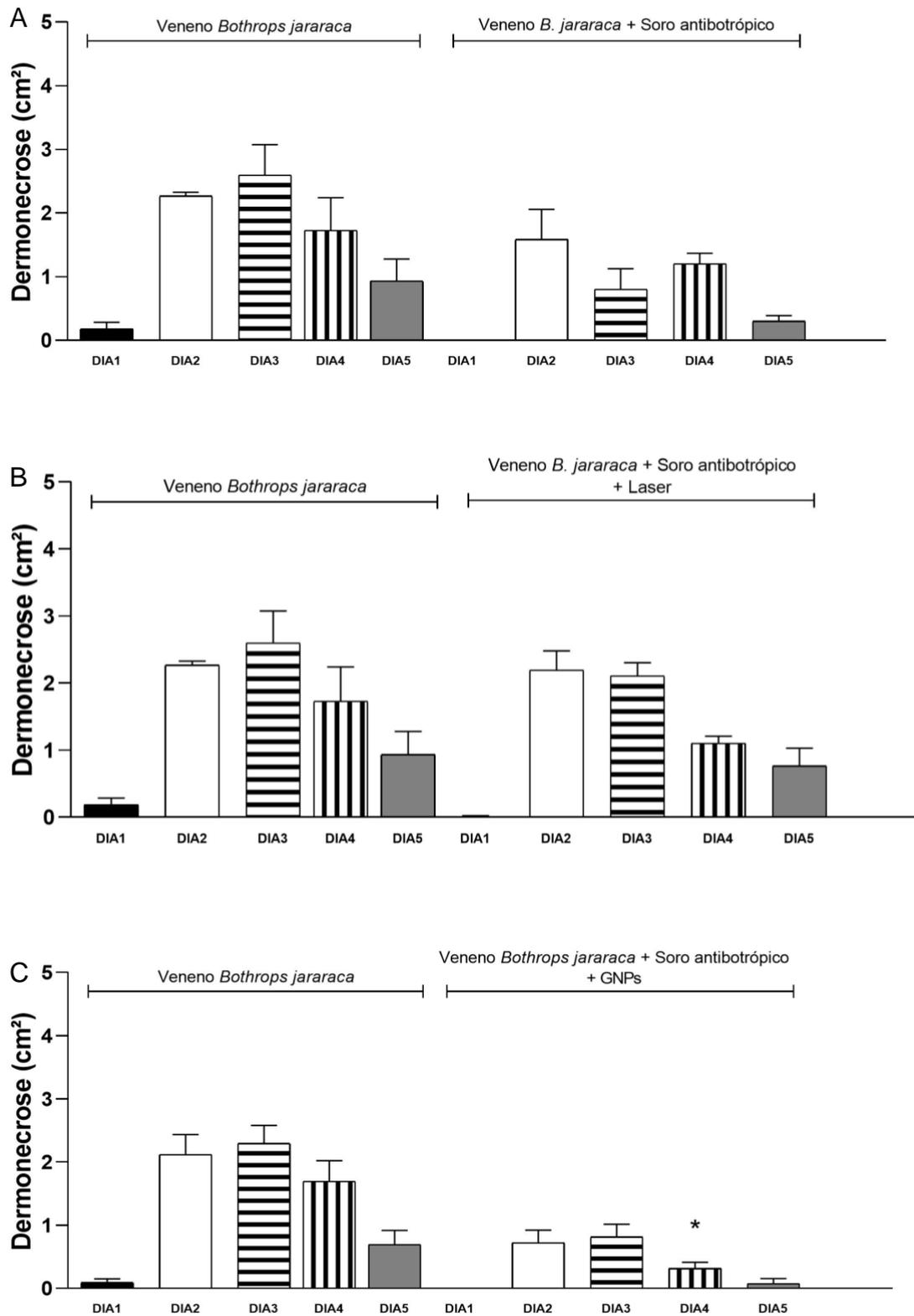
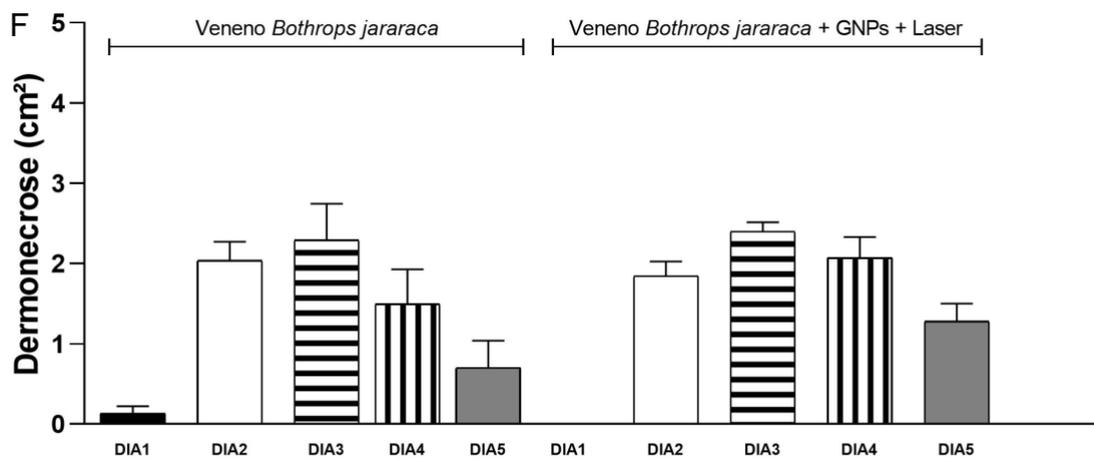
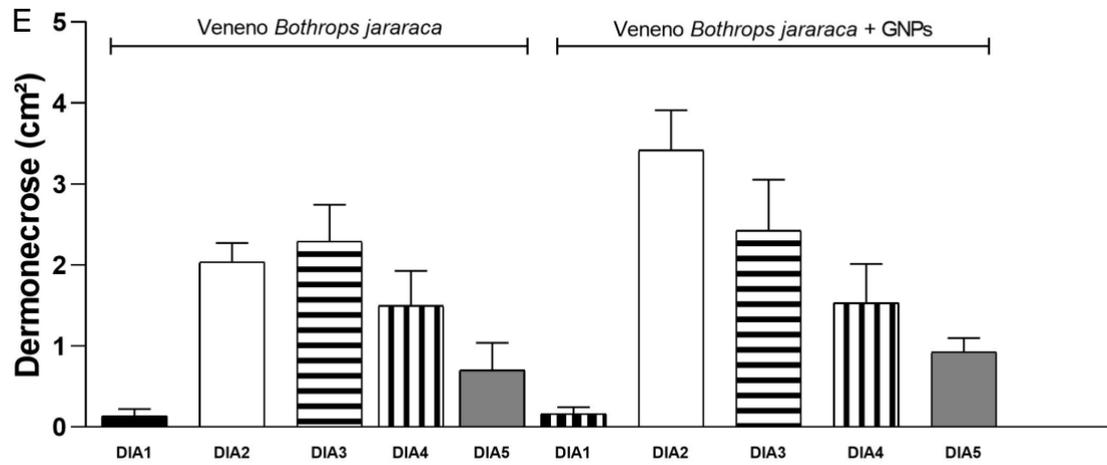
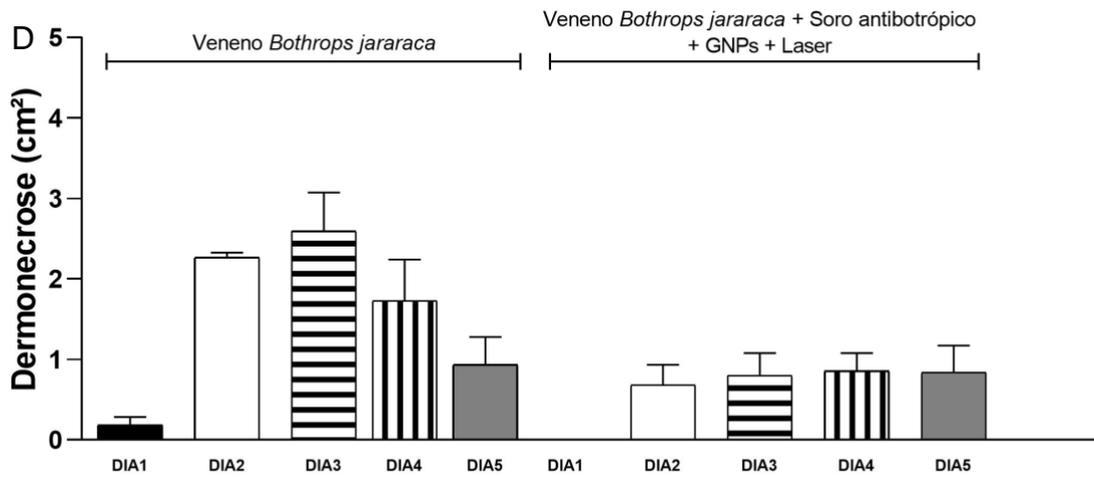


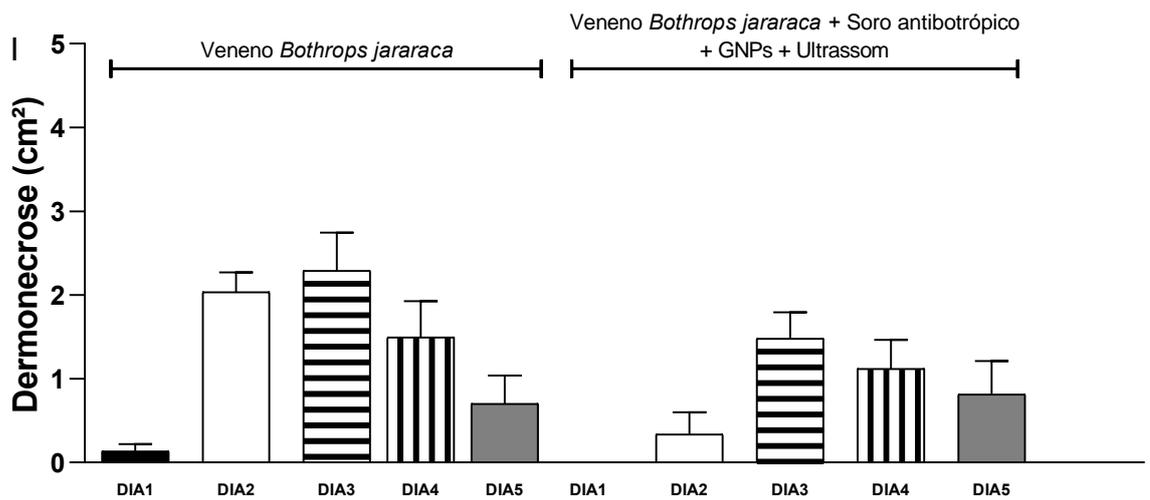
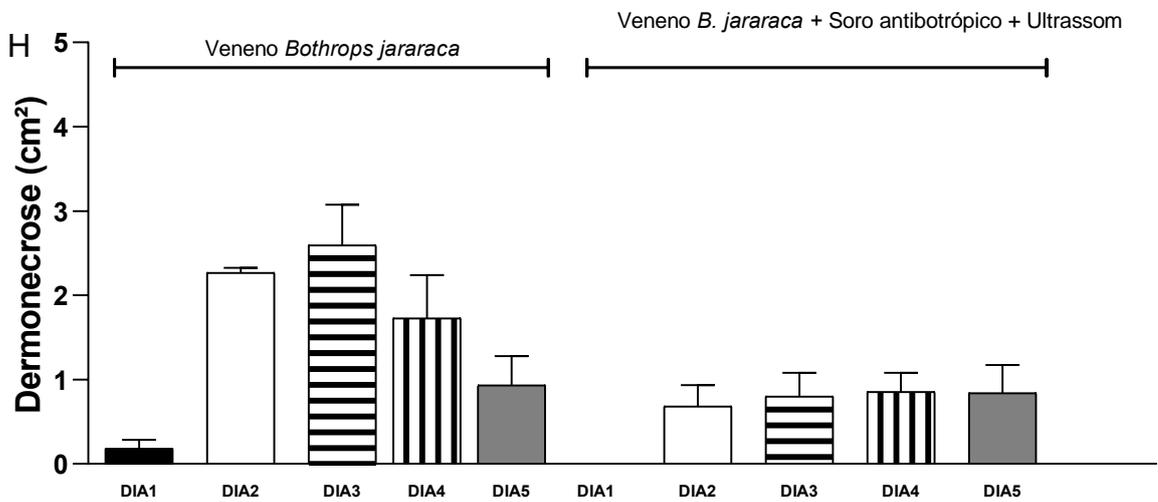
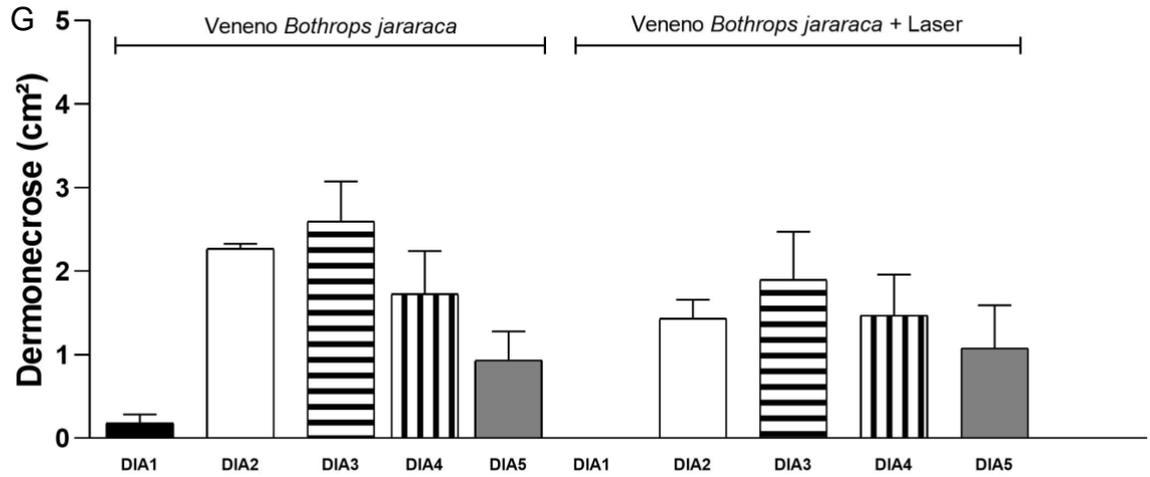
Figura 6. Imagens TEM (esquerda) e UV-Vís (direita) das GNPs. Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. Dermonecrose

A dermonecrose foi mensurada através da área da dermonecrose obtida por meio de fotografias tiradas diariamente, utilizando o *software Image J* e os resultados estão apresentados nos gráficos a seguir (Figura 7). Ao lado esquerdo do gráfico, em todos os grupos, encontra-se o grupo não tratado, que recebeu apenas o veneno de *B. jararaca*, e a respectiva avaliação de dermonecrose do dia primeiro ao quinto. No lado direito encontra-se o tratamento proposto e a avaliação da dermonecrose do dia primeiro ao quinto. Cada dia de tratamento foi comparado com o mesmo dia do grupo não tratado, com o objetivo de demonstrar a diferença da evolução da dermonecrose entre o grupo sem tratamento e o tratamento proposto.







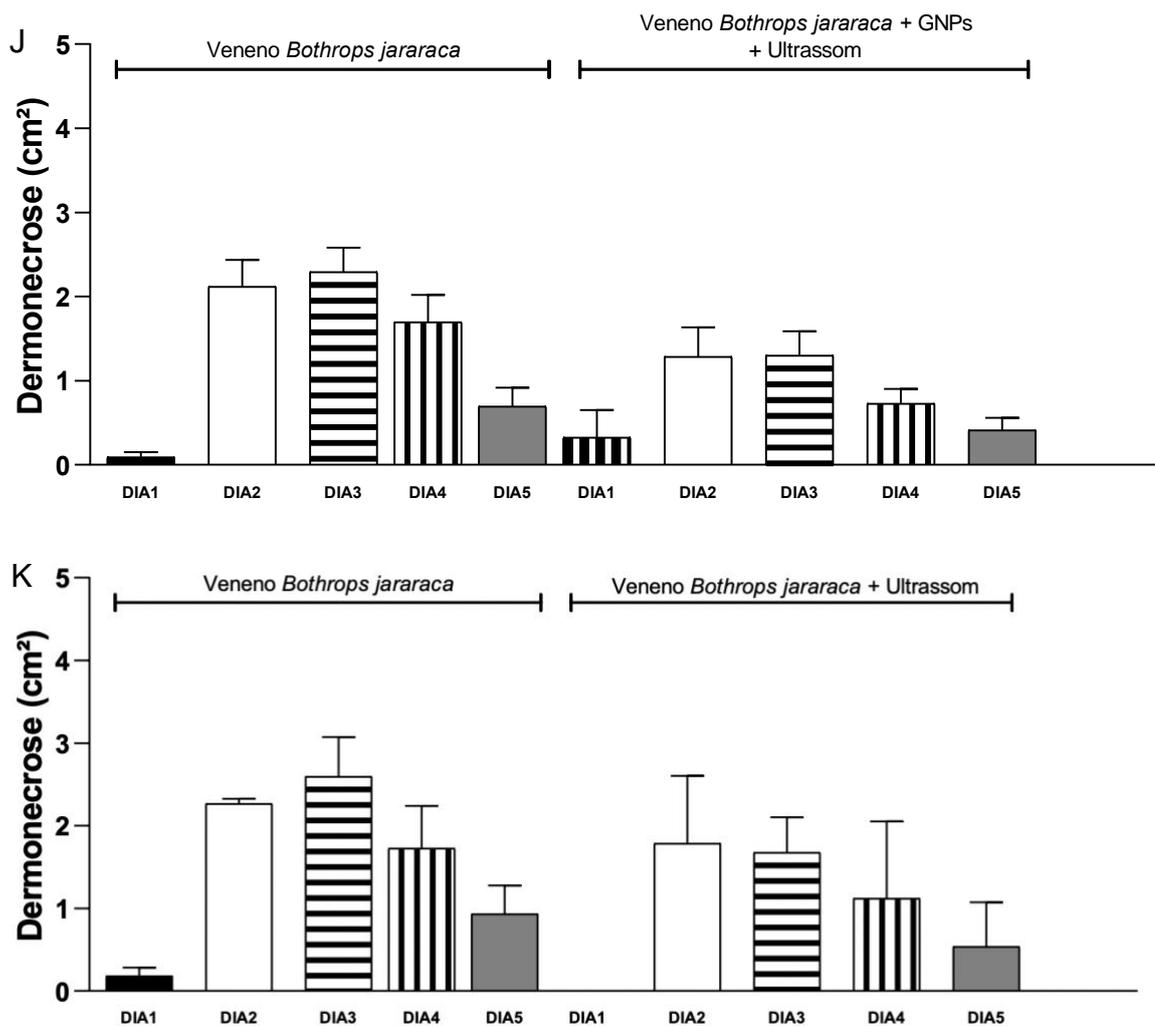


Figura 7. Evolução da dermonecrose no músculo gastrocnêmio. As medidas foram realizadas diariamente, a partir de 6 horas (dia 1) após a aplicação do veneno de *B. jararaca*, durante todos os dias, entretanto os gráficos trazem os resultados apenas dos primeiros 5 dias. Cada dia do grupo não tratado (lado esquerdo) foi comparado com o respectivo dia do grupo tratado (lado direito). O cálculo da área da dermonecrose foi realizado através do *software ImageJ*, através das fotos obtidas das lesões diariamente durante o experimento. Os resultados estão representados através da média \pm erro padrão. *($p < 0,05$) estabelece comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno dentro do mesmo dia. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e post-hoc de Bonferroni. Fonte: Elaborada pela autora.

A maioria dos grupos apresentou redução na extensão da dermonecrose, entretanto, apenas o grupo com tratamento SA + GNPs apresentou redução significativa no dia 4, enquanto os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa.

4.4. Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas a partir do músculo gastrocnêmio direito (local onde o veneno foi injetado) dos camundongos.

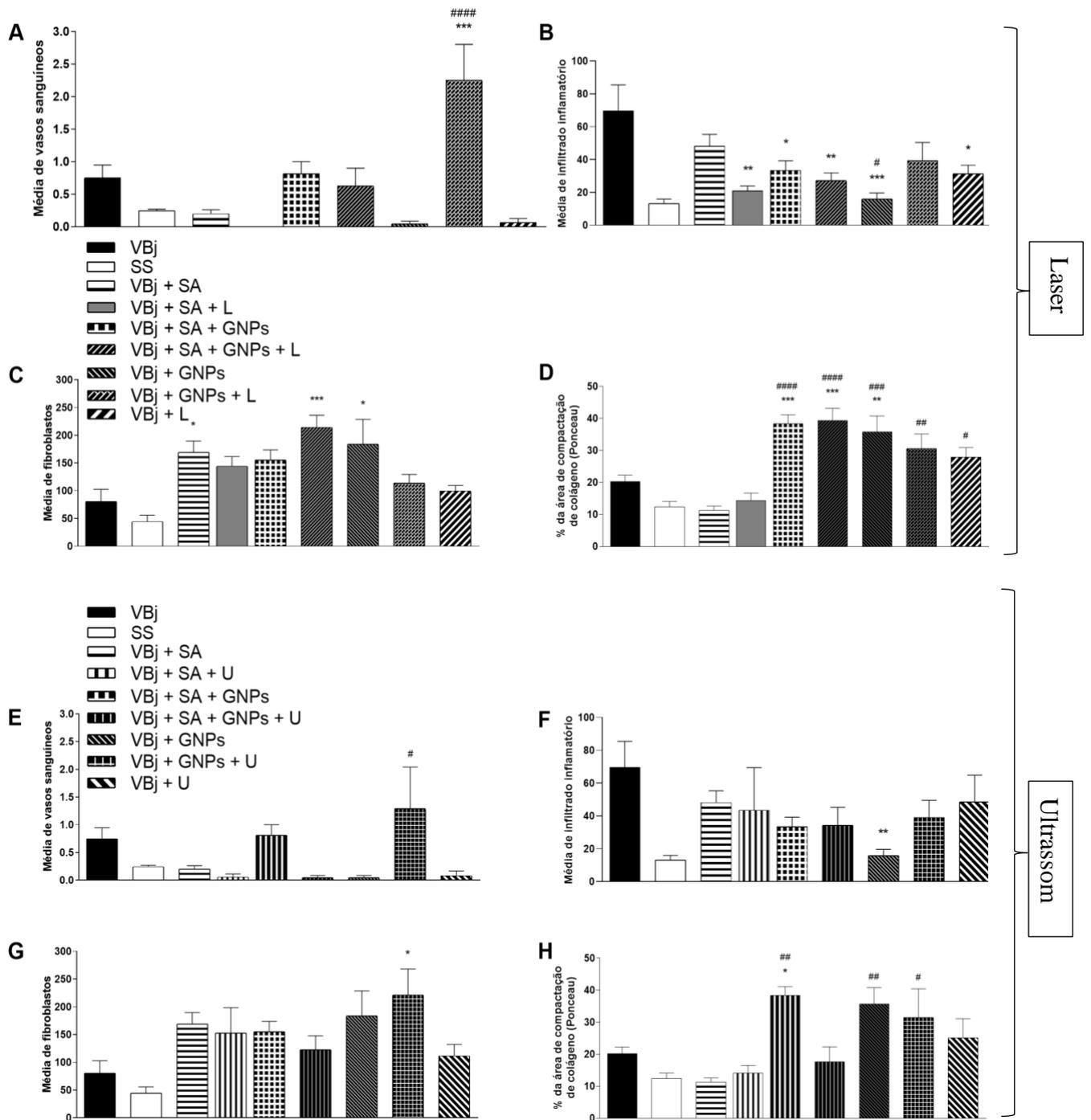


Figura 8. Análise histológica do músculo gastrocnêmio. Análise histológica do músculo gastrocnêmio tratado com combinações terapêuticas envolvendo o laser (A-D) e ultrassom (E-H). Contagem média do número de vasos sanguíneos (A e E), infiltrado inflamatório (B e F), fibroblastos (C e G) e colágeno (D e H), realizadas a partir do músculo gastrocnêmio retirado dos camundongos 24 horas após o último dia de tratamento. VBj: Veneno *B. jararaca*; SS: Solução salina; SA: Soro antibotrópico; GNPs: nanopartículas de ouro; L: laser; U: ultrassom. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) e *** ($p < 0,0005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo não tratado (VBj) e # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,005$), ### ($p < 0,0005$) e #### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão (VBj + SA). Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post-hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 8 apresenta os resultados das análises histológicas realizadas no músculo gastrocnêmio dos camundongos eutanasiados após sete dias de experimento. De A a D estão os

resultados dos tratamentos com soro antibiótico (SA), GNPs e laser (L); de E a H estão os resultados dos tratamentos com soro antibiótico (SA), GNPs e ultrassom (U).

É possível observar que o infiltrado inflamatório no grupo tratado com GNPs apresenta uma redução significativa (#) quando comparado com o tratamento padrão (SA). Além disso, também houve redução estatisticamente significativa (*, ** e ***) de infiltrado inflamatório nos grupos tratados com SA + L, SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs e L, quando comparados ao grupo não tratado (VBj). Os tratamentos com SA e GNPs + L não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo não tratado, e o GNPs + L também não apresentou diferença significativa quando comparado ao tratamento padrão.

No que se refere aos resultados histológicos dos vasos sanguíneos, o grupo GNPs + L apresentou aumento significativo comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão. Em contrapartida, os grupos envolvendo os tratamentos SA + L, SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs e L não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo que recebeu o tratamento padrão e ao grupo não tratado.

Ao analisar a média de fibroblastos, os grupos SA + GNPs + L e GNPs apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo não tratado. Enquanto os grupos tratados com SA + L, SA + GNPs, GNPs + L e L não apresentaram diferença significativa quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo não tratado.

Analisando o percentual da área de compactação de colágeno, observa-se aumento nos grupos SA + GNPs, SA + GNPs + L e GNPs, quando comparado ao grupo sem tratamento e ao tratamento padrão. Os grupos GNPs + L e L também apresentaram aumento significativo quando comparado ao tratamento padrão. O único grupo que não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão foi o SA + L.

Nesta mesma figura 8 (E-H), observa-se a análise histológica dos tratamentos realizados com SA, GNPs e ultrassom (U). Como já observado anteriormente, o grupo GNPs apresentou redução significativa no infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo não tratado. Entretanto, os grupos de tratamento SA + U, SA + GNPs, SA + GNPs + U, GNPs + U e U não apresentaram diferença significativa na redução do infiltrado inflamatório quando comparados com o tratamento padrão ou com o grupo não tratado.

Houve um aumento da média de vasos sanguíneos no grupo GNPs + U quando comparado ao tratamento padrão, bem como na média de fibroblastos, quando comparada ao

grupo não tratado. Todavia, não houve diferença significativa em relação aos parâmetros supracitados nos grupos de tratamento SA + U, SA + GNPs, SA + GNPs + U, GNPs e U.

O percentual da área de compactação de colágeno apresentou diferença significativa nos grupos SA + GNPs, GNPs e GNPs + U comparado ao tratamento padrão, enquanto o grupo SA + GNPs apresentou também diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado. Já os grupos SA + U, SA + GNPs + U e U não apresentaram diferença significativa quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo não tratado.

4.5. Determinação de oxidantes, dano oxidativo e produção de antioxidantes

Para avaliar o efeito dos tratamentos, foi analisado a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, dano oxidativo e a produção de antioxidantes. Os resultados foram analisados em partes para facilitar a visualização e comparação dos tratamentos. Os gráficos do lado esquerdo da figura demonstram os resultados dos tratamentos envolvendo a aplicação e combinação de soro antibotrópico (SA), GNPs e laser (L), enquanto do lado direito estão os gráficos com a combinação terapêutica que envolve o ultrassom (U) em vez do laser, com os tratamentos supracitados. Foram utilizadas amostras do coração, rins e músculo gastrocnêmio dos camundongos submetidos ao experimento.

4.5.1. Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico

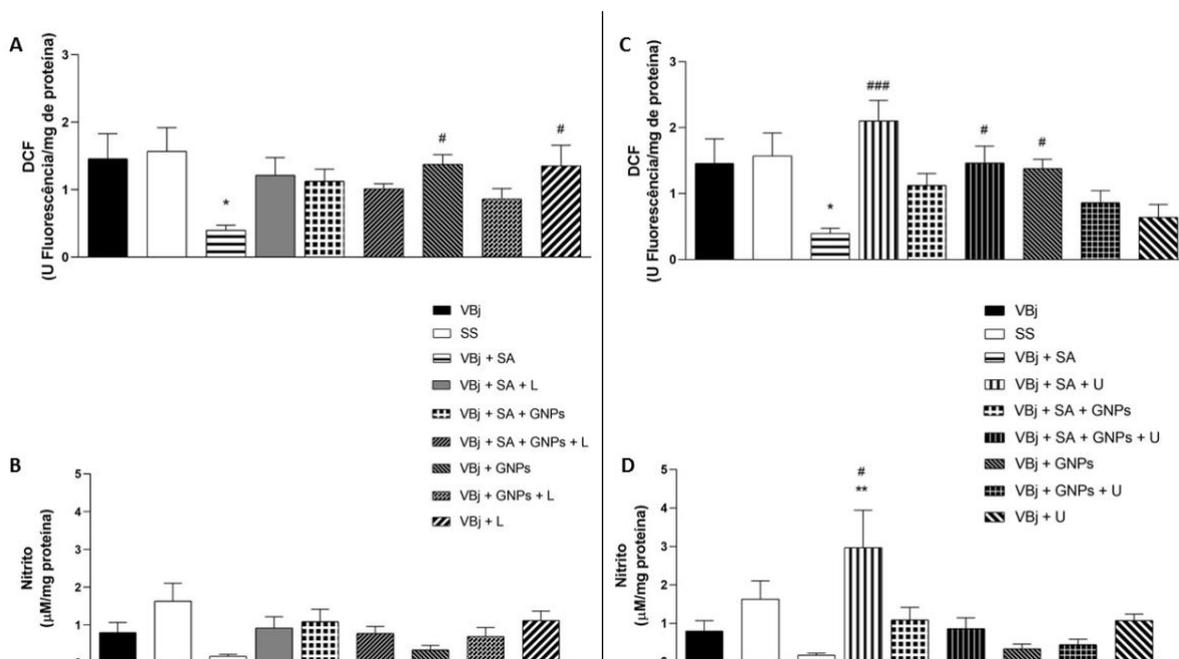


Figura 9. Determinação de oxidantes: diclorofluoresceína (DCF) e nitrito (NO) no coração. Dosagens de DCF (A e C) e Nitrito (B e D) realizadas a partir do coração retirado dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibiótico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,005$) estabelece comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e # ($p < 0,05$) e ### ($p < 0,0005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 9 demonstra a produção de oxidantes dosados através do DCF e NO, no coração. Observa-se (Figura 9 – A) que os níveis de DCF tiveram aumento nos grupos tratados com GNPs e nos grupos tratados com laser (L) quando comparados ao tratamento padrão. Em contrapartida, os grupos de tratamento SA + L, SA + GNPs, SA + GNPs + L e GNPs + L não apresentaram diferença significativa quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo não tratado. Os níveis de NO (B) também não apresentaram diferença significativa em nenhum grupo.

Em relação aos níveis de DCFH (Figura 9 – C), os grupos SA + U, SA + GNPs + U e GNPs também apresentaram aumento quando comparados ao tratamento padrão. Entretanto, os grupos SA + GNPs, GNPs + U e U não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado.

Os níveis de NO aumentaram apenas na combinação terapêutica de SA + U (D), comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão, enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao tratamento padrão e ao grupo não tratado.

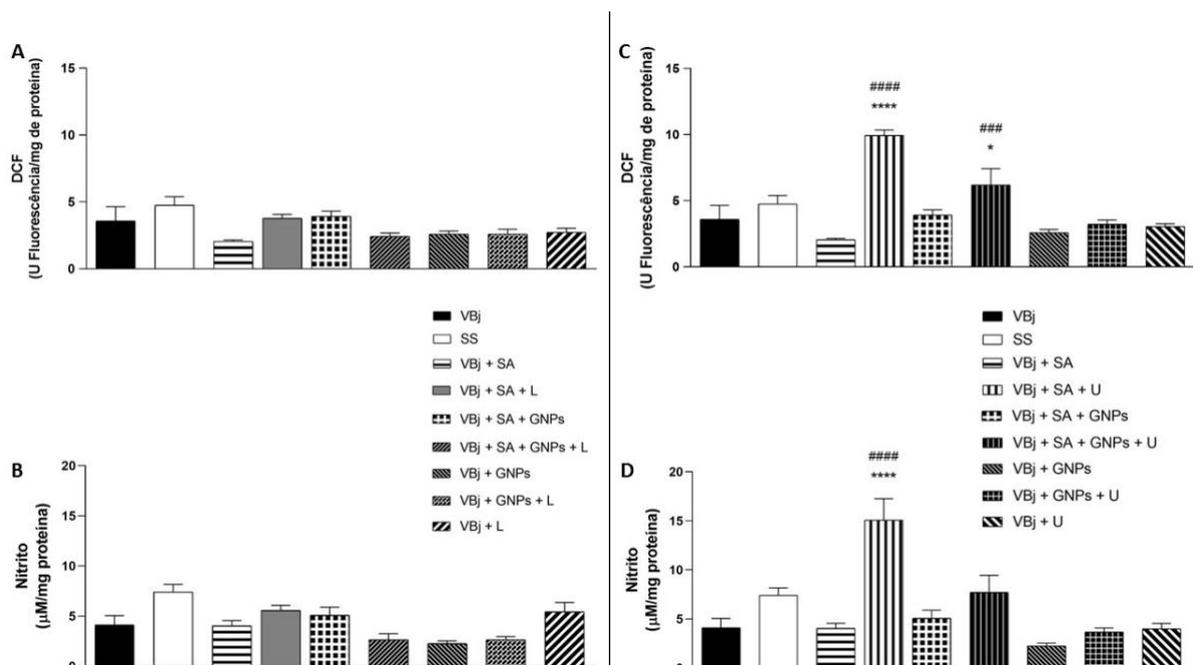
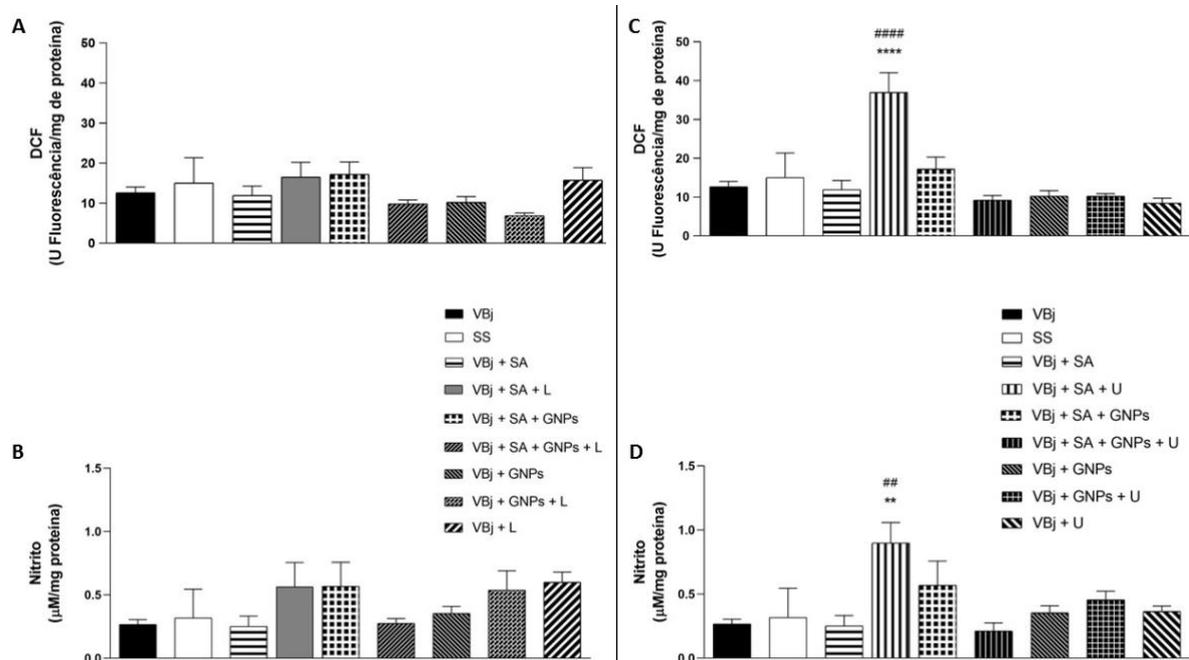


Figura 10. Determinação de oxidantes: diclorofluoresceína (DCF) e nitrito (NO) nos rins. Dosagens de DCF (A e C) e Nitrito (B e D) realizadas a partir dos rins retirados dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibiótico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,00005$) estabelece comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e ### ($p < 0,0005$) e #### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 10 demonstra a produção de oxidantes dosados através do DCF e NO, nos rins. Não houve diferença significativa entre as combinações terapêuticas incluindo o laser (Figura 10 – A e B). Os níveis de DCF e NO aumentaram apenas nas combinações terapêuticas envolvendo ultrassom (Figura 10 – C e D). Os grupos SA + U e SA + GNPs + U apresentaram aumento significativo nos níveis de DCF quando comparados aos grupos sem tratamento e tratamento padrão (C). Já os grupos SA + GNPs, GNPs, GNPs + U e U não apresentaram diferença significativa em relação aos níveis de DCF quando comparados ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado. Somente o grupo SA + U apresentou aumento nos níveis de NO, comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão (Figura 10 – D), enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa.



A Figura 11 demonstra a produção de oxidantes dosados através do DCF e NO, no músculo gastrocnêmio. Os níveis de DCF e NO avaliados no músculo gastrocnêmio nas combinações terapêuticas envolvendo laser (Figura 11 – A e B) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado.

Somente o grupo SA + U apresentou aumento nos níveis de DCF e NO, quando comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão (Figura 11 – C e D), enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa.

4.5.2. Determinação do dano oxidativo

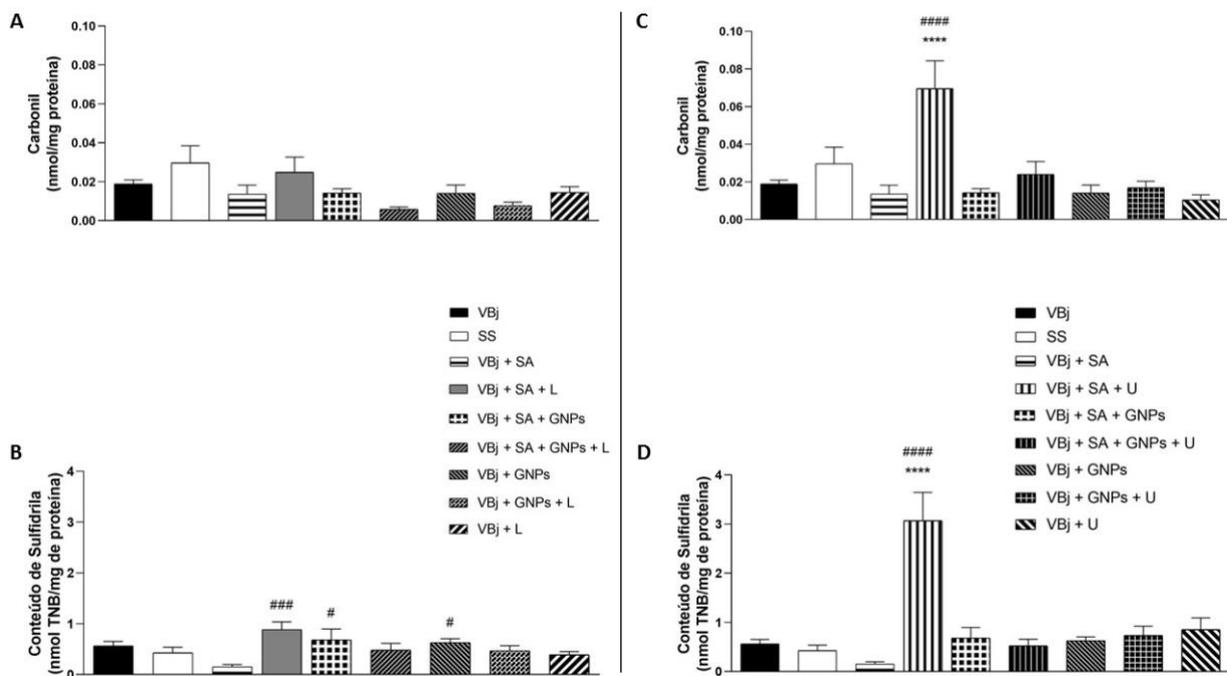


Figura 12. Determinação do dano oxidativo no coração: carbonil e conteúdo de sulfidril. Dosagens do conteúdo de carbonil (A e C) e sulfidril (B e D) realizadas a partir do coração retirado dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibotrópico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. **** ($p < 0,00005$) estabelece comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e # ($p < 0,05$), ### ($p < 0,0005$) e ##### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 12 demonstra o dano oxidativo, avaliado através dos níveis de carbonil e sulfidril, no coração. Não houve diferença significativa nos níveis de carbonil nas combinações

terapêuticas envolvendo laser (Figura 12 – A) quando comparadas ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado. O conteúdo de sulfidril apresentou aumento nos grupos SA + L, SA + GNPs e GNPs, quando comparado ao tratamento padrão (Figura 12 - B), enquanto as combinações terapêuticas SA + GNPs + L, GNPs + L e L não apresentaram diferença significativa.

No grupo tratado com SA + U houve aumento nos níveis de carbonil, bem como no conteúdo de sulfidril, quando comparados ao grupo não tratado e ao tratamento padrão (Figura 12 – C e D). Todavia, as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa nesses parâmetros.

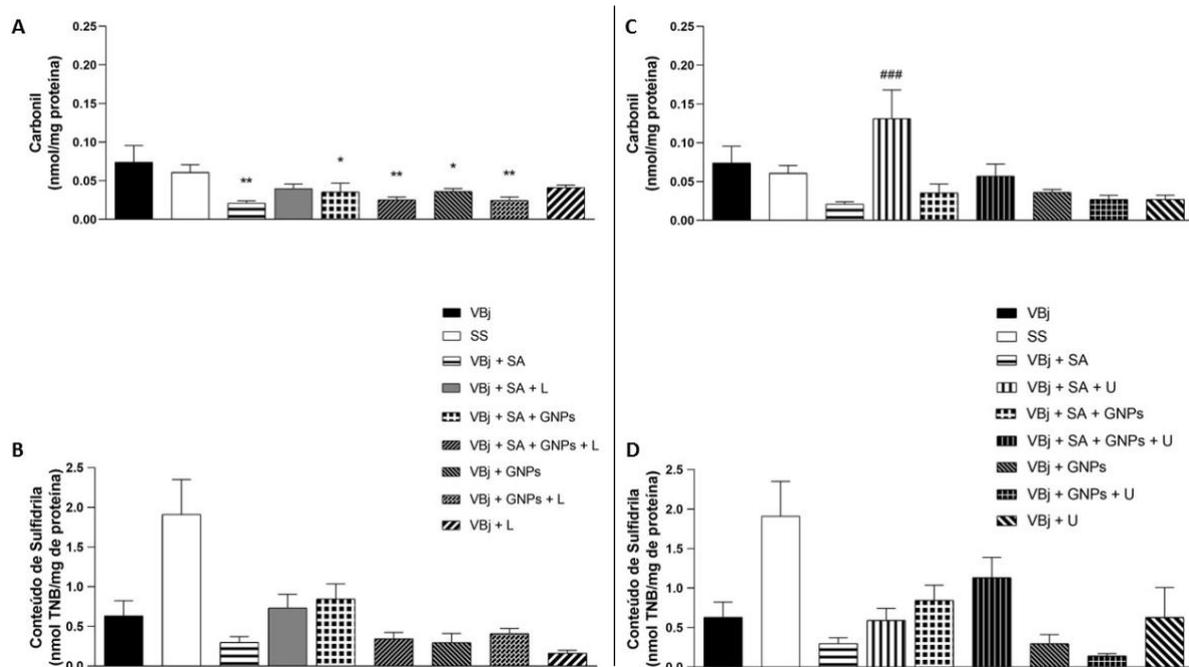


Figura 13. Determinação do dano oxidativo nos rins: carbonil e conteúdo de sulfidril. Dosagens do conteúdo de carbonil (A e C) e sulfidril (B e D) realizadas a partir dos rins retirado dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibiótico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e ### ($p < 0,0005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 13 demonstra o dano oxidativo, avaliado através dos níveis de carbonil e sulfidril, nos rins. É possível observar que houve redução dos níveis de carbonil nos rins nos grupos SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs e GNPs + L quando comparado ao grupo não tratado (Figura 13 – A). Somente os grupos SA + L e L não apresentaram diferença significativa

diante da mesma comparação. Nenhuma das combinações terapêuticas envolvendo laser apresentou diferença significativa quando comparadas ao tratamento padrão.

O grupo tratado com SA + U apresentou aumento nos níveis de carbonil quando comparado ao tratamento padrão (Figura 13 – C), enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa diante da mesma comparação, bem como quando comparadas ao grupo não tratado. O conteúdo de sulfidrilas não apresentou diferença significativa em nenhuma das combinações terapêuticas envolvendo ultrassom (Figura 13 – D).

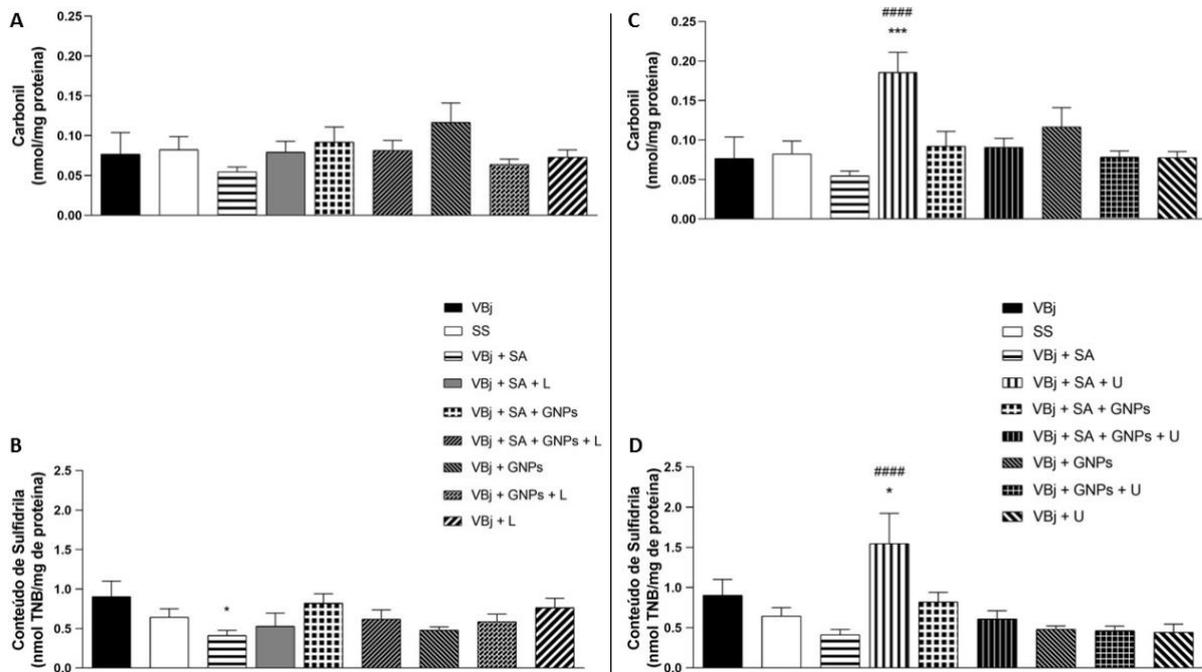


Figura 14. Determinação do dano oxidativo no músculo gastrocnêmio: carbonil e conteúdo de sulfidrilas. Dosagens do conteúdo de carbonil (A e C) e sulfidrilas (B e D) realizadas a partir do músculo gastrocnêmio retirado dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibotrópico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. * ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,0005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e #### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 14 demonstra o dano oxidativo, avaliado através dos níveis de carbonil e sulfidrilas, no músculo gastrocnêmio. Não houve diferença significativa nos níveis de carbonil e sulfidrilas nas combinações terapêuticas envolvendo laser quando comparadas ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado (Figura 14 – A e B).

O grupo SA + U apresentou aumento nos níveis de carbonil e sulfidrilas (Figura 14 – C e D) no músculo gastrocnêmio quando comparado ao tratamento padrão e ao grupo não tratado, enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa.

4.5.2.1. Determinação da produção de antioxidantes

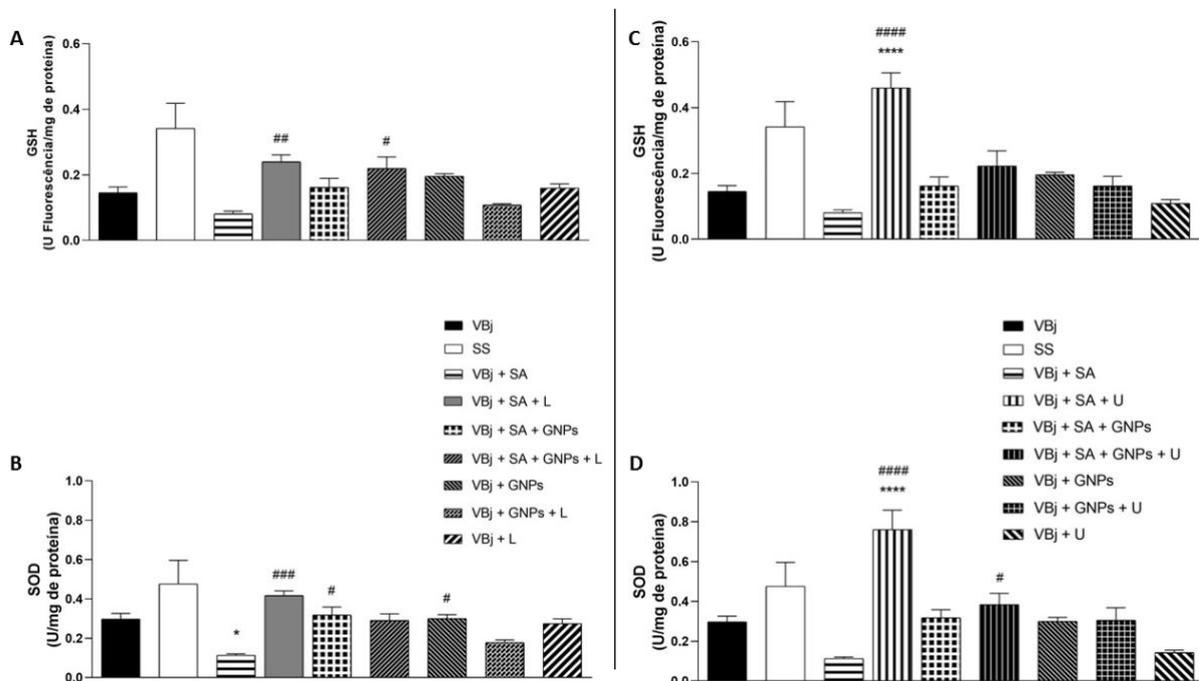


Figura 15. Determinação de antioxidantes no coração: superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH). Dosagens do conteúdo de SOD (B e D) e GSH (A e C) realizadas a partir do coração retirado dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibotrópico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$), e **** ($p < 0,00005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,005$), ### ($p < 0,0005$) e ##### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 15 demonstra a produção de antioxidantes no coração através da dosagem superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH). Observa-se o aumento dos níveis de GSH nos grupos SA + L, SA + GNPs + L (Figura 15 – A), quando comparadas ao tratamento padrão, enquanto as combinações terapêuticas SA + GNPs, GNPs, GNPs + L e L não apresentaram diferença significativa diante da mesma comparação, bem como quando comparadas ao grupo não tratado.

Os níveis de SOD apresentaram aumento significativo nos grupos SA + L, AS + GNPs e GNPs (Figura 15 – B) quando comparados ao tratamento padrão. Todavia, as combinações SA + GNPs + L, GNPs + L e L não apresentaram diferença significativa diante da mesma comparação, bem como quando comparadas ao grupo não tratado.

Em relação às combinações terapêuticas envolvendo ultrassom, houve um aumento de GSH no grupo SA + U (Figura 15 – C), quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo

não tratado, enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa diante das mesmas comparações.

O grupo SA + GNPs + U também apresentou aumento significativo quando comparado ao tratamento padrão, bem como o grupo SA + U, que apresentou aumento significativo comparado ao tratamento padrão e ao grupo não tratado (Figura 15 – D). As combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa.

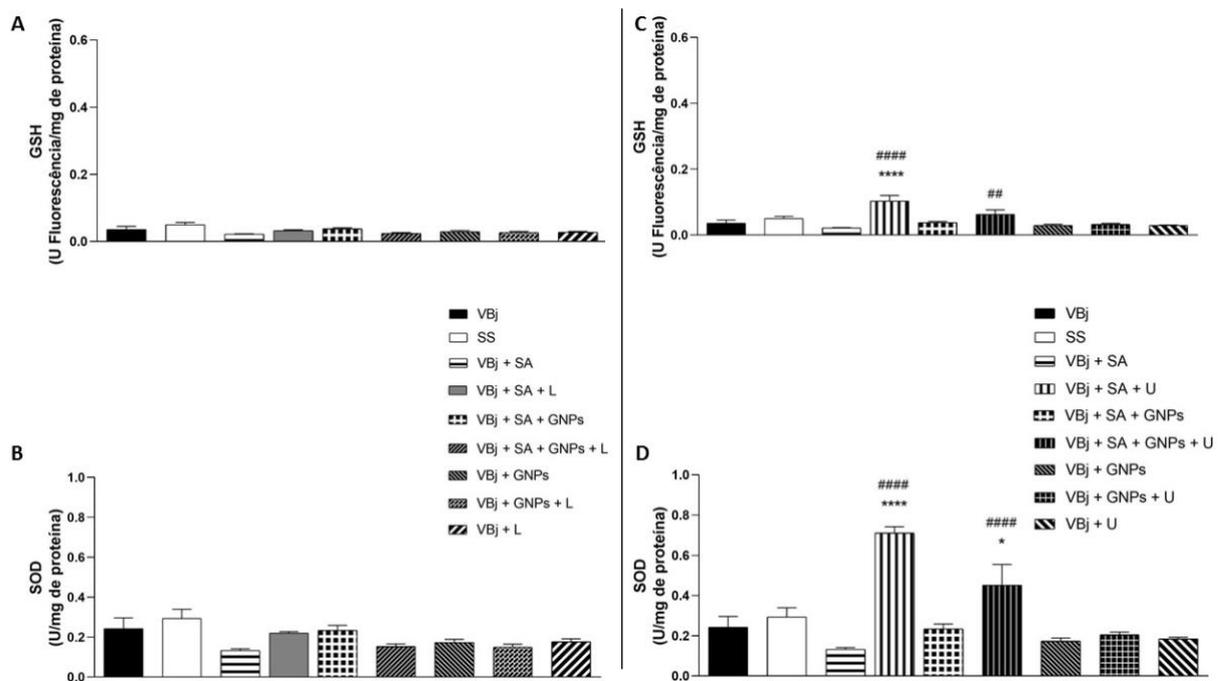


Figura 16. Determinação de antioxidantes nos rins: superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH). Dosagens do conteúdo de SOD (B e D) e GSH (A e C) realizadas a partir dos rins retirados dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibiótico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo soro SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$), e **** ($p < 0,00005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e ## ($p < 0,005$) e #### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 16 demonstra a produção de antioxidantes nos rins através da dosagem SOD e GSH. As combinações terapêuticas envolvendo laser (Figura 16 – A e B) não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo que recebeu tratamento padrão e ao grupo não tratado.

Observou-se aumento significativo de GSH e SOD nos grupos SA + U e SA + GNPs + U (Figura 16 – C e D), quando comparados ao tratamento padrão. Além disso, dentre esses grupos, com exceção do SA + GNPs + U, quando avaliado os níveis de GSH, as outras

combinações apresentaram diferença significativa também quando comparadas ao grupo não tratado. Os tratamentos SA + GNPs, GNPs, GNPs + U e U não apresentaram diferença significativa diante das comparações supracitadas.

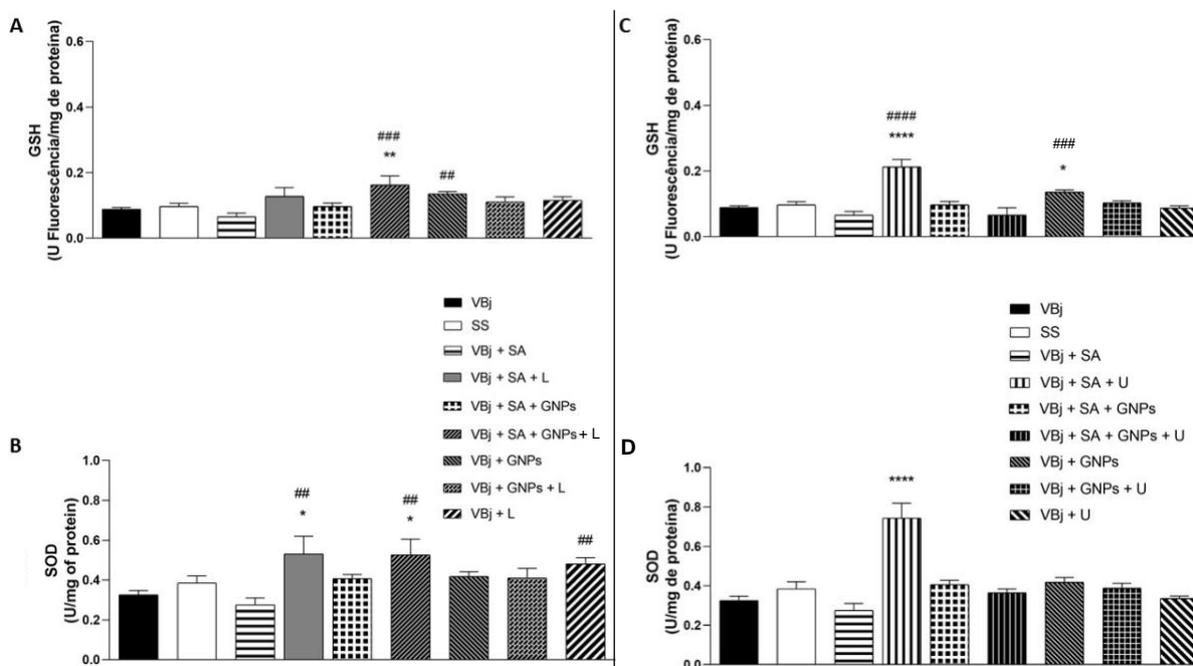


Figura 17. Determinação de antioxidantes no músculo gastrocnêmio: superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH). Dosagens do conteúdo de SOD (B e D) e GSH (A e C) realizadas a partir do músculo gastrocnêmio retirados dos camundongos após a eutanásia 24 horas após o último dia de tratamento. Os resultados A e B referem-se à combinação terapêutica envolvendo soro antibiótico (SA), nanopartículas de ouro (GNPs) e laser (L), enquanto os resultados C e D referem-se ao tratamento envolvendo SA, GNPs e ultrassom (U). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), e **** ($p < 0,00005$) estabelecem comparação entre os grupos tratados e o grupo veneno e # ($p < 0,005$), ### ($p < 0,0005$) e #### ($p < 0,00005$) entre os grupos tratados e o tratamento padrão. Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way* e *post hoc* de Dunnett. Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 17 demonstra a produção de antioxidantes no músculo gastrocnêmio através da dosagem SOD e GSH. Em relação aos níveis de antioxidantes no músculo gastrocnêmio analisados nas combinações terapêuticas envolvendo laser, observou-se um aumento significativo de GSH nos grupos SA + GNPs + L e GNPs (Figura 17 – A), quando comparados ao tratamento padrão. O grupo SA + GNPs + L também apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado. As combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa nos níveis de GSH diante das mesmas comparações.

Os grupos SA + L, SA + GNPs + L e L apresentaram aumento no nível de SOD (Figura 17 – B) quando comparados ao tratamento padrão. Além disso, os grupos SA + L e SA + GNPs + L também apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo não tratado.

No que se refere ao tratamento com ultrassom, os grupos SA + U e GNPs apresentaram aumento significativo de GSH (Figura 17 – C) quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo não tratado, enquanto as combinações terapêuticas restantes não apresentaram diferença significativa. O grupo SA + U apresentou aumento nos níveis de SOD (Figura 17 – D) quando comparado ao grupo não tratado, enquanto as outras combinações terapêuticas não apresentaram diferença significativa.

4. DISCUSSÃO

Envenenamentos causados pela serpente *B. jararaca* podem levar a graves consequências à saúde da vítima, especialmente devido à ferida induzida pelo veneno. O efeito ocorre devido à ação das miotoxinas e metaloproteinases presentes no veneno e, principalmente, pelo dano estrutural nos vasos sanguíneos induzido pelas SVMPs (Escalante et al, 2011). A maioria dos acidentes relatam o mecanismo rexe, um extravasamento de sangue advindo dos capilares causado pela ação das SVMPs. A destruição dos capilares sanguíneos através desse mecanismo prejudica a correta perfusão de oxigênio e nutrientes no tecido, agravando a mionecrose (Gutiérrez & Rucavado, 2000).

A maior parte do veneno de *B. jararaca* é composto por SVMPs, que estão envolvidas na patogênese da mionecrose e dano epitelial como a dermonecrose (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Para avaliar as consequências dos tratamentos na dermonecrose, cada dia de tratamento – até o quinto dia – foi comparado com cada dia do grupo não tratado (Figura 7). Foram avaliados apenas os cinco primeiros dias devido à dificuldade de visualização da área dermonecrótica por consequência do crescimento da pelagem dos camundongos.

Os grupos GNPs e GNPs + L foram os únicos a reduzir a dermonecrose quando comparados ao grupo não tratado, entretanto, essa redução não foi significativa. O grupo SA + GNPs apresentou uma redução significativa de dermonecrose no quarto dia de tratamento. O quarto dia de tratamento em todos os grupos demonstrou um aumento na média da área dermonecrótica, enfatizando a importância de promover um tratamento que reduza a média desse parâmetro nesse período de recuperação. A recuperação das feridas pode ser estimulada por antioxidantes, bem como pelas propriedades das GNPs (Lau et al, 2017). Ademais, as GNPs podem ser facilmente administradas via tópica, contribuindo para um tratamento acessível no que se refere ao custo e facilidade de aplicação.

Acredita-se que os tratamentos melhoraram a qualidade da recuperação cutânea – hipótese que se justifica pelos resultados obtidos nas análises bioquímicas e histológicas – entretanto, devido ao tempo de tratamento e ao potencial danoso do veneno, não foi possível observar essa melhora no aspecto superficial da pele. Além disso, há um agravamento de importante consideração: os camundongos foram depilados com lâminas e, devido à sua agitação, mesmo sob um pouco de sedação, e em decorrência da sensibilidade da pele dos animais, pequenos cortes aconteceram durante esse processo, intensificando o dano na camada mais superficial da derme.

O veneno também contém outros componentes miotóxicos como a PLA₂ e LAAO (Teixeira et al, 2005; Farias et al, 2018; Costal-Oliveira et al, 2019). Estudos anteriores já demonstraram mionecrose após a inoculação do veneno de *B. jararaca* (Queiroz et al, 1985; Cedro et al, 2018), portanto, para avaliar as consequências da inoculação do veneno de *B. jararaca*, o músculo gastrocnêmio, local onde o veneno foi injetado, foi analisado. Os cortes histológicos (Figura 8 – A) dos vasos sanguíneos do músculo gastrocnêmio demonstram que o tratamento com GNPs + L pode ser útil para recuperar a integridade vascular. Isso pode ser observado devido ao aumento estatisticamente significativo da média de vasos sanguíneos quando comparado ao grupo não tratado e ao grupo tratado conforme o padrão preconizado atualmente, através da imunoterapia com o soro antibotrópico.

Danos teciduais podem ativar a angiogênese com o objetivo de recuperar o tecido e reparar a ferida. A angiogênese é uma importante etapa envolvida na regeneração muscular e é um processo controlado principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) (Darweesh et al, 2019), uma proteína com atividade de permeabilidade vascular (Shibuya, 2011). Além disso, por conta dessa nova vascularização, estudos demonstram que há o estímulo da expansão de células satélites basais adjacentes a esses novos capilares. Essas células encontradas no músculo são capazes de promover a regeneração muscular mesmo após danos extensos (Williams et al, 2019). A literatura relata que a fotobiomodulação é extremamente eficaz em modular a expressão do mRNA do VEGF, o que acarreta a formação de novos vasos sanguíneos durante o reparo músculo esquelético (Alves et al, 2014a). Apesar de não ter dosado este parâmetro, pode-se sugerir, devido aos resultados obtidos, que este fator provavelmente foi estimulado pelo laser neste experimento.

Os grupos tratados com GNPs isoladamente não apresentaram diferença na angiogênese quando comparados com o tratamento padrão, bem como com o grupo tratado apenas com laser, mas a associação de ambos mostrou um ótimo resultado no desenvolvimento de vasos sanguíneos. As GNPs já demonstraram efeitos anti-angiogênicos em diversos estudos (Mukherjee et al, 2005; Darweesh et al, 2019), portanto, o seu efeito quando utilizada isoladamente já era esperado. Lau et al, 2017 também observaram que a associação entre GNPs e fotobiomodulação acelerou a cicatrização de feridas por acelerar a vascularização, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Quanto ao grupo laser, pode-se supor que este grupo não recebeu todo o potencial do tratamento no músculo gastrocnêmio porque foi utilizado o comprimento de onda de 670 nm. O comprimento de onda de 904 nm é o mais recomendado para danos musculares (Walt, 2006), mas este trabalho teve como objetivo inicial

apenas o tratamento da dermonecrose. Supõe-se que alterando o comprimento de onda para 904 nm, possa se obter melhores resultados a nível muscular.

No que se refere ao resultado histológico dos tratamentos com ultrassom, pode-se observar (Figura 8 – E) que o grupo GNPs + U apresentou aumento estatisticamente significativo na angiogênese quando comparado ao tratamento padrão. Esse resultado já foi observado por Lau et al, 2017 ao tratar uma ferida causada por uma incisão em ratos utilizando a fotobiomodulação associadas às GNPs. Apesar do referido efeito anti-angiogênico das GNPs, elas também apresentam efeitos não anti-angiogênicos, como relatado no estudo supracitado. Além disso, relata-se uma relação entre a dose das GNPs e o seu efeito anti-angiogênico (Leu et al, 2012). A associação entre as GNPs e o ultrassom promoveu um benefício na sinalização da angiogênese. Provavelmente, o ultrassom aumentou a permeabilidade das GNPs, estimulando o efeito angiogênico. Esse mecanismo que o ultrassom possui de aumentar a permeabilidade é chamado fonoforese e é considerado seguro para a administração de diversos fármacos por ser através da via transdérmica (Othman et al, 2023), não sobrecarregando o sistema digestivo e hepático (Haupenthal et al., 2020).

Existem diversos questionamentos relacionados à biocompatibilidade das GNPs e, nesse sentido cabe ressaltar que, especialmente as de menor tamanho (< 20 nm), já apresentaram efeitos deletérios em estudos *in vitro* e *in vivo* onde os organismos foram expostos a longos períodos de tratamentos sob uma forma de administração interna. Portanto, em um contexto de exposição invasiva, sua utilização é sugerida por um curto prazo (Lopez-Chaves et al, 2018). Não obstante, neste trabalho foram utilizadas GNPs de 20 nm, diferente do aludido estudo, além de serem aplicadas em um protocolo de tratamento tópico de curta duração – sete (7) dias.

Os dados observados no estudo supracitado foram obtidos administrando-se as GNPs via intraperitoneal por um período de nove (9) dias, sendo, portanto, um protocolo de administração muito mais invasivo que o utilizado neste trabalho. Em contrapartida a alguns estudos relacionados às GNPs, o ultrassom é considerado um recurso minimamente invasivo e bastante seguro para promover a permeação de ativos através da pele (Soares Lima et al, 2023). Além disso, o ultrassom também promove o alívio da dor (Saliba et al, 2007; Alfredo et al, 2009) benefício importante neste caso, uma vez que essa também é uma das consequências causadas pelo envenenamento botrópico (Gutiérrez et al, 2017).

Outros autores já observaram que frequências terapêuticas entre 1 e 3 MHz promovem o aumento da penetração de pequenas moléculas através da pele (Mitragotri & Kost, 2004). Esse fato encontrado na literatura suporta o resultado encontrado neste trabalho, onde apenas o

grupo GNPs + U apresentou diferença significativa na angiogênese. As GNPs têm potencial de reduzir mudanças morfológicas, bem como marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (Haupenthal et al, 2019). Por conseguinte, pode-se sugerir que a permeação das GNPs através da fonoforese proporcionou uma ação mais efetiva do potencial de ambos os tratamentos (Rhode et al, 2019).

A regulação do processo inflamatório é essencial para promover uma reparação tecidual adequada e requer a ação organizada de etapas que incluem a participação de citocinas, fatores de crescimento, macrófagos, tecido conjuntivo e células inflamatórias. A reparação muscular ocorre em três etapas: degeneração, reparo e remodelamento; e cada etapa tem eventos fisiológicos particulares (Alves et al, 2014b; Järvinen et al, 2007).

Quando ocorre um dano como o causado pelo envenenamento, esses processos são desregulados em consequência da ação mecânica que ocorre pela picada, bem como pelos componentes do veneno como as SVMPs e PLAs, que têm um importante papel na resposta inflamatória local (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Portanto, é importante selecionar um tratamento que tenha potencial de aumentar a recuperação tecidual controlando a inflamação.

As GNPs isoladamente podem ter ação anti-angiogênica e, portanto, serem úteis no controle da inflamação, especialmente na fase aguda (Rocha et al, 2019), resultado observado neste trabalho (Figura 8 – B), onde o grupo tratado com GNPs reduziu o infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo que recebeu tratamento padrão. Sabe-se que a modulação da angiogênese é importante no processo cicatricial das feridas (Arnold & West, 1991) e estudos já demonstraram que a morfologia muscular durante o dano pode melhorar com a utilização de GNPs (Pinho et al, 2022). Ademais, devido à escala nanométrica, as GNPs possuem a capacidade de permear o tecido epitelial com facilidade (da Rocha et al, 2019), característica importante para o controle da progressão da lesão causada por veneno botrópico.

Observa-se (Figura 8 – A e B) que as GNPs administradas isoladamente suprimiram a angiogênese enquanto reduziram o infiltrado inflamatório. As feridas crônicas tendem a permanecer estáticas na fase inflamatória, podendo infeccionar e dificultar o tratamento (Othman et al, 2023). Portanto, o excesso do efeito anti-angiogênico provocado pelas GNPs, apesar de parecer prejudicial para a renovação epitelial, garantiu a redução do processo inflamatório. Confirma-se então a qualidade promissora da proposta de tratamento deste estudo, que sugere a combinação das GNPs com recursos eletrofísicos, o que parece implicar em um equilíbrio entre os efeitos relacionados aos processos angiogênicos e inflamatórios (Figura 8 – A, B, E e F).

Ademais, os grupos de tratamento SA + L, SA + GNPs, SA + L + GNPs, GNPs e L apresentaram redução significativa do infiltrado inflamatório quando comparados com o grupo não tratado (Figura 8 – B). Lakyová et al, 1959 e Assis et al, 2013 também observaram uma diminuição da resposta inflamatória após o tratamento com laser aplicado em danos musculares, bem como o aumento da angiogênese. Esses efeitos podem ser explicados por conta do potencial do laser em irradiar o tecido, estimulando a absorção de fótons pelos cromóforos, especialmente na mitocôndria (Zein et al, 2018). Consequentemente, existem alterações em muitos parâmetros fisiológicos, como, por exemplo, a ativação de fatores de transcrição e produção de fatores de crescimento, que podem reduzir o processo inflamatório (Dias da Silva et al, 2023; De Freitas & Hamblin, 2016; Chung et al, 2013).

Os grupos tratados com ultrassom não apresentaram diferença significativa na redução do infiltrado inflamatório (Figura 8 - F). Este resultado já era esperado, uma vez que o potencial do ultrassom, nesse sentido, se ampara principalmente na sua atividade de permeação de ativos através da fonoforese. Dessa forma, a literatura sugere sua utilização em associação com fármacos de acordo com o objetivo desejado (Haupenthal et al., 2020). Entretanto, neste estudo, não foi possível observar redução do infiltrado inflamatório em nenhuma combinação envolvendo o ultrassom associado às GNPs.

Além disso, é possível notar um desvio padrão considerável e bastante variável na maioria dos grupos, sendo que apenas o grupo tratado com GNPs isoladamente apresentou redução significativa do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo não tratado. Supõe-se que esses resultados se devam ao superaquecimento do ultrassom durante a aplicação dos tratamentos, uma vez que o aparelho é programado para alcançar uma temperatura máxima de 41° C, para aplicações em humanos. De fato, a literatura sugere que o aumento da temperatura entre 39° C e 45° C é necessário para provocar algum estímulo de colágeno em humanos (Merrick et al, 2002). Ainda, o calor promovido pelo ultrassom também pode auxiliar no alívio da dor, aumento do fluxo sanguíneo e redução da inflamação crônica (Rhode et al, 2019). Porém, os animais utilizados neste estudo possuíam porte pequeno e, ao observar seu “desconforto” durante a aplicação, havia pausas e a consequente despadronização do tratamento. Ademais, evidências sugerem que área a ser alcançada pelo ultrassom não deve ser superior a 2 ou 3 vezes à área de ação efetiva. Isso evita a perda de calor promovida pelo ultrassom durante a aplicação (Rhode et al, 2019). Entretanto, neste caso, a área de tratamento, que compreendia o músculo gastrocnêmio e áreas adjacentes de um camundongo, era menor que o cabeçote do aparelho de ultrassom, o que leva a crer que a temperatura alcançou níveis

além dos recomendados, especialmente para um animal de pequeno porte, durante a maior parte do tratamento. Não obstante, durante a aplicação do ultrassom em superfícies irregulares, é necessário um meio de acoplamento que garanta o contato do cabeçote com o tecido a fim de evitar interrupções na transmissão do ultrassom (Draper et al, 2010). Contudo, como mencionado, o cabeçote do equipamento disponível para os tratamentos possuía um diâmetro muito grande comparado à área de aplicação nos camundongos, o que implicou no prejuízo da qualidade do tratamento.

Os grupos SA + GNPs + L e GNPs tiveram aumento na média de fibroblastos em comparação ao grupo não tratado (Figura 8 - C). Os fibroblastos são células que possuem papel fundamental na promoção de síntese de colágeno no local do dano tecidual. Ademais, apesar de não apresentar diferença significativa entre os tratamentos propostos e o tratamento padrão, houve um aumento significativo maior da média de fibroblastos no grupo tratado com laser e GNPs associados ao soro antibotrópico do que no grupo tratado apenas com o soro, quando comparados ao grupo não tratado. Estudos já demonstraram que o tratamento com laser acelera a regeneração tecidual por conta da proliferação de fibroblastos (Alves et al, 2014; Cressoni et al, 2008). Ou seja, a associação dos tratamentos propostos com o tratamento padrão pode ser benéfica por promover maior regeneração tecidual em menos tempo. O estudo citado usou laser para tratar uma lesão causada por incisão, enquanto neste trabalho a lesão foi causada pelos componentes do veneno. Portanto, acredita-se que a junção do laser e GNPs tenha potencializado esse efeito, mesmo diante do envenenamento botrópico.

Apesar da aludida função anti-angiogênica das GNPs, especialmente na fase aguda da inflamação, há estudos que a relatam como não anti-angiogênica, além de sugeri-la com potencial de aumentar a proliferação de fibroblastos (Lau et al, 2017), o que explicaria a proliferação aumentada observada nos grupos SA + GNPs + L e GNPs. Sabe-se que a dose de GNPs pode influenciar a sua ação (Leu et al, 2012), induzindo ou não a atividade anti-angiogênica. Portanto, supõe-se que uma adequação de dose, bem como de período de aplicação de GNPs durante o tratamento, alcançaria resultados ainda mais satisfatórios no tratamento dessas feridas.

O grupo GNPs + U apresentou aumento no percentual de fibroblastos quando comparado ao grupo não tratado (Figura 8 – G). Esse efeito pode ser atribuído ao potencial das GNPs, como citado anteriormente, bem como do ultrassom de promover efeitos fisiológicos que resultam na estimulação dos fibroblastos (Maia Filho et al, 2010; Hauptenthal et al, 2020).

Os tratamentos com laser, GNPs ou ambos, com ou sem o soro antibotrópico associado – com exceção do grupo SA + L – foram os que apresentaram os melhores resultados na análise histológica referente à produção de colágeno do músculo gastrocnêmio (Figura 8 – D). Estes resultados provam que estes tratamentos podem melhorar a regeneração tecidual e, conseqüentemente, o fechamento da ferida (Darweesh et al, 2019). O tratamento foi aplicado sobre (GNPs) e ao redor da lesão (laser), com a finalidade de atingir o músculo gastrocnêmio, entretanto, os resultados na reparação epitelial também puderam ser observados *in vivo*.

As SVMs e as PLAs são responsáveis por degradar alguns componentes da membrana basal, incluindo colágeno, e sua injeção intramuscular pode levar à mionecrose (Gutiérrez et al, 2017; Gutiérrez and Rucavado 2000; Rucavado et al, 1995), bem como à dermonecrose decorrente da difusão do veneno no local da picada. As metaloproteinases hemorrágicas levam a uma pobre regeneração muscular (Gutiérrez & Rucavado, 2000), portanto, é importante propor tratamentos que ajam para a resolução desse problema.

Lau et al, 2017 também usaram a combinação de laser com GNPs para tratar feridas em ratos e observaram que o tratamento melhorou a produção de colágeno, resultado que também pôde ser observado nesse estudo. Eles demonstraram que a associação desses dois tratamentos foi mais efetiva para acelerar a cicatrização da ferida induzindo angiogênese, deposição de colágeno e melhorando a epitelização. Portanto, os resultados deste estudo estão de acordo com a literatura no que diz respeito à deposição de colágeno e angiogênese.

A deposição de colágeno, estimulada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4, é uma das etapas que marcam a reparação tecidual (Tidball, 2017; Hauptenthal et al, 2020). É possível observar que além dos tratamentos supracitados, a associação de GNPs + U também apresentou aumento no percentual de compactação de colágeno quando comparado ao tratamento padrão (Figura 8 – H), indicando o benefício desse protocolo na cicatrização da ferida ocasionada pelo veneno da serpente *B. jararaca*. Além da ação por meio da fonoforese, que parece ter favorecido a permeação das GNPs, o ultrassom é considerado muito eficaz na etapa de reparo tecidual por conta dos seus efeitos anti-inflamatórios - especialmente na fase crônica – e estimulantes da síntese proteica (Hauptenthal et al., 2020; Alfredo et al., 2009).

Na análise das combinações terapêuticas incluindo o ultrassom, os grupos SA + GNPs e GNPs também demonstraram ser promissores no que se refere ao estímulo de colágeno em uma ferida ocasionada pelo envenenamento botrópico quando comparados ao tratamento padrão (Figura 8 – H). As interações das GNPs com as proteínas, especialmente na MEC, têm

sido amplamente investigadas para aplicações biomédicas devido à, por exemplo, facilidade de síntese e a adaptabilidade do formato e tamanho das GNPs, de acordo com o objetivo. A MEC é o primeiro conjunto de biomoléculas encontrado pelas GNPs quando adentram o tecido epitelial e é onde encontra-se o colágeno, a proteína mais abundante em animais (Tang et al, 2019; Shoulders & Raines, 2009). Corroborando com os resultados obtidos neste estudo, a literatura relata que as GNPs, por conta dos seus efeitos antimicrobianos e antioxidantes, auxiliam na cicatrização e na reparação do colágeno (Soliman et al, 2022).

Dessa forma, na tabela abaixo estão organizados um resumo dos tratamentos que apresentaram melhores resultados nas análises histológicas, observando-se claramente uma predominância das combinações incluindo GNPs.

Tabela 67. Resumo dos resultados histológicos observados no músculo gastrocêmio

Análise histológica	Combinações terapêuticas com os melhores resultados
↑ Vasos sanguíneos (angiogênese)	# GNPs + L e GNPs + U * GNPs + L
↓ Infiltrado inflamatório	# GNPs * SA + L; SA + GNPs; SA + L + GNPs; GNPs e L
↑ Fibroblastos	* SA + GNPs + L; GNPs e GNPs + U
↑ Área de compactação de colágeno	# SA + GNPs; SA + GNPs + L; GNP; GNP + L; L e GNPs + U * SA + GNPs; SA + GNPs + L, GNPs e SA + GNPs

refere-se às combinações terapêuticas que alcançaram diferença significativa quando comparados ao grupo submetido ao tratamento padrão; * refere-se às combinações terapêuticas que alcançaram diferença significativa quando comparadas ao grupo não tratado. GNPs: nanopartículas de ouro; L: laser; SA: soro antibotrópico.

Quando ocorre o dano muscular, principalmente em envenenamentos ocasionados pelo gênero *Bothrops*, existem muitos processos celulares e moleculares envolvidos, como hemorragia intensa que leva à necrose ao redor do local da picada, formação de edema, ruptura dos miofibroblastos, infiltração inflamatória, citocinas pró-inflamatórias e produção de proteases, seguido de propagação da resposta inflamatória. A fase inflamatória que acontece após o dano tecidual ocorre em conjunto com o aumento de EROs e redução de antioxidantes, levando ao dano oxidativo, prejudicando a cicatrização de feridas (Assis et al, 2013; Dröge 2002; Farias et al, 2018; Homma and Tu 1971; Järvinen et al, 2005; Lau et al, 2017; Tidball 2005b).

Diante desse fato, para avaliar os níveis de oxidantes foram dosados os níveis de DCF e NO. Com o objetivo de avaliar o dano ocasionado pelo veneno no local da picada, o músculo gastrocnêmio também foi submetido às análises para avaliação dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo. Nenhuma combinação terapêutica incluindo laser ou GNPs apresentou diferença nos níveis de oxidantes (Figura 11 – A e B). Além disso, foi observado um aumento significativo nos níveis de GSH no músculo gastrocnêmio nos grupos SA + GNPs + L e GNPs (Figura 17 – A) em relação ao tratamento padrão, também corroborando com outros estudos, que demonstraram o potencial antioxidante das GNPs, que foram capazes de aumentar os níveis de enzimas antioxidantes (BarathManiKanth et al, 2010). Os níveis de SOD também apresentaram aumento, quando comparado com o tratamento padrão, nos grupos SA + L, SA + GNPs + L e L (Figura 17 – B), reafirmando o potencial antioxidante desses tratamentos. Esses resultados mostram que a adição de tratamentos com laser e GNPs ao tratamento padrão pode auxiliar a melhorar os níveis de antioxidantes, promovendo uma melhor recuperação da ferida nas vítimas da picada pela serpente *B. jararaca*.

Ainda a respeito do músculo gastrocnêmio, a combinação terapêutica SA + U apresentou aumento significativo nos níveis de EROs (Figura 11 – C e D) em um dos marcadores de dano oxidativo, o carbonil, (Figura 14 – C) quando comparado ao grupo não tratado e ao tratamento padrão. Em contrabalanço ao carbonil, que apresentou aumento em seus níveis nessa combinação terapêutica, os níveis de sulfidrilas também aumentaram (Figura 14 – D). Em paralelo, os níveis de antioxidantes também apresentaram aumento nesse mesmo grupo, além de terem aumentado também no grupo tratado com GNPs isoladamente, quando comparado ao grupo que recebeu o tratamento padrão e ao grupo não tratado (Figura 17 – C e D). De acordo com a literatura (Pisoschi et al, 2021), pode-se sugerir que o aumento do dano oxidativo e de oxidantes estimulou o sistema antioxidante, aumentando seus níveis a fim de evitar o estresse oxidativo.

Ressalta-se ainda que as EROs são essenciais para proteger as células contra a invasão de agentes infecciosos, sendo, portanto, benéficas quando produzidas em quantidade moderada; em excesso, podem causar dano ao tecido e prejuízo à cicatrização (Silveira et al, 2016b). Dessa forma, apesar da diferença significativa no aumento da carbonilação, houve também um aumento no conteúdo de sulfidrilas. O grupo sulfidrilas é bastante vulnerável à oxidação por EROs, o que resulta na alteração das funções proteicas. Portanto, por ser o alvo deste ataque direto, ele age como um sistema de defesa versátil contra as perturbações bioquímicas (Baba e

Bhatnagar, 2018) e seu aumento pode ser um reflexo do efeito protetivo do tratamento nesse tecido.

As miotoxinas e metaloproteinases presentes no veneno podem alcançar o endotélio, que afetam o papel protetor do sistema cardiovascular (Franco et al, 2016). Isso pode ser observado no coração devido a produção de oxidantes demonstradas pelos níveis de DCF nos grupos tratados com GNPs e laser (Figura 9 – A). O aumento desses parâmetros foi observado nos grupos onde o tratamento (laser ou GNPs) foi aplicado separadamente. Isso indica que esses tratamentos sem a administração de soro antibotrópico não alcançaram o sistema cardiovascular, o que era suposto, uma vez que foram direcionados para um tratamento local.

No que se refere aos grupos submetidos ao tratamento com o ultrassom, os grupos SA + U, SA + GNPs + U e GNPs apresentaram aumento significativo de oxidantes quando comparados ao tratamento padrão, especialmente nos níveis de DCF (Figura 9 – C). Entretanto, ao comparar com o grupo não tratado, não houve diferença significativa. O soro antibotrópico é administrado via intravenosa, enquanto o tratamento com ultrassom e GNPs é aplicado de forma tópica, sobre a área lesionada e região adjacente. Diante dos resultados observados, pode-se supor que, devido ao mecanismo de ação, bem como a forma de administração, apenas o tratamento padrão, com o soro antibotrópico, conseguiu manter os níveis de oxidantes baixos comparado aos outros grupos. Sendo assim, pode-se sugerir que os tratamentos com agentes eletrofísicos e GNPs não reduziram os níveis de oxidantes no coração por conta da velocidade de ação do veneno e do alcance dos tratamentos, que foram planejados para agir a nível epitelial e muscular.

Apesar do aumento dos níveis de oxidantes no coração, o dano oxidativo, avaliado pelos níveis de carbonil e sulfidril, apresentou aumento nos grupos SA + L, SA + L e GNPs, somente no que se refere ao conteúdo de sulfidril (Figura 12 – A e B), sugerindo um efeito protetivo. A associação entre o SA e o laser mostrou um melhor resultado nos níveis de sulfidril. Essa consequência pode ter sido causada pelo tratamento com o soro, que tem potencial de neutralizar efeitos sistêmicos (Battellino et al, 2003). O grupo SA + U também apresentou aumento no conteúdo de sulfidril, bem como nos níveis de carbonil, quando comparado aos grupos não tratado e ao tratamento padrão (Figura 12 – C e D). Esses resultados indicam um controle do dano oxidativo, observado pelo aumento dos níveis de sulfidril, ao mesmo tempo que indicam o dano, através do aumento nos níveis de carbonil.

Os níveis de antioxidantes, mensurados através dos níveis de SOD e GSH, apresentaram aumento, inclusive, no mesmo grupo de tratamento que apresentou redução do dano oxidativo

no coração (SA + L) (Figura 15 – A e B). Esse fato pode ocorrer porque o laser tem potencial de estimular as defesas antioxidantes, como já demonstrado em outros trabalhos (Avni et al, 2005; Silveira et al, 2016a). Portanto, pode-se sugerir que os efeitos do tratamento local alcançaram o sistema cardiovascular, melhorando os níveis de antioxidantes. Além disso, o laser apresenta potencial antioxidante especialmente no que refere ao estímulo da SOD (De Freitas & Hamblin, 2016) e esse resultado pode ser observado no grupo SA + L, que apresentou maior diferença nos níveis de SOD quando comparado ao tratamento padrão.

Os níveis de antioxidantes no coração também demonstraram aumento significativo de GSH nos grupos SA + L e SA + GNPs + L, quando comparados ao tratamento padrão. Além disso, também apresentaram aumento de SOD nos grupos SA + L, SA + GNPs e GNPs, comparado ao tratamento padrão. Quando ocorre uma lesão muscular aguda como a ocasionada pelo veneno de *B. jararaca*, inicia-se uma cascata inflamatória que desencadeia a lesão local e prejuízo em tecidos distantes da lesão, como o coração. Esse episódio é caracterizado pela redução da capacidade antioxidante decorrente do acúmulo de oxidantes (Avni et al, 2005). É notável que os protocolos com soro antibotrópico associado ao laser e/ou GNPs aumentaram os níveis de antioxidantes, indicando a possibilidade desses tratamentos alcançarem o sistema cardiovascular.

As GNPs são conhecidas pelo seu grande potencial antioxidante (Kim et al, 2015), característica fundamental para um tratamento com o objetivo de promover uma rápida cicatrização de feridas cutâneas. Portanto, os resultados observados neste trabalho indicam que a utilização desses tratamentos em conjunto ou individualmente pode contribuir para o aumento dos níveis de antioxidantes além do local da picada, favorecendo a recuperação e minimizando os danos ocasionados pelo veneno.

No que se refere aos resultados observados nos grupos de tratamentos que incluem o ultrassom (Figura 15 – C e D), foi possível observar um aumento significativo nos níveis de antioxidantes no grupo SA + U comparado aos grupos que receberam o tratamento padrão e ao não tratado. Além disso, o grupo SA + GNPs + U também apresentou aumento significativo nos níveis de SOD quando comparado ao tratamento padrão. Esse resultado foi esperado, uma vez que se sabe do potencial do ultrassom de facilitar a permeação de agentes antioxidantes, como é o caso das GNPs (Haupenthal et al., 2020). Dessa forma, o ultrassom também se mostra um tratamento promissor, alcançando resultados benéficos a nível cardiovascular nos animais envenenados.

Os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo também foram dosados nos rins, uma vez que esse órgão é um dos mais afetados em casos de envenenamentos por serpentes, local onde a jararagina provoca grave toxicidade, podendo ocasionar lesão renal aguda, levando ao óbito (Mota et al, 2021; Bjarnason & Fox, 1994; Albuquerque et al, 2020). Não houve resultados visíveis nos níveis de oxidantes nos tratamentos com laser (Figura 10 – A e B) e esse resultado é considerado positivo, alcançando o mesmo potencial do tratamento padrão, que também não apresentou diferença nos níveis de oxidantes quando comparado ao grupo não tratado.

Os tratamentos com ultrassom apresentaram aumento significativo de oxidantes nos grupos SA + U e SA + GNPs + U (Figura 10 – C e D). Apesar disso, os níveis de defesas antioxidantes nesses grupos também apresentaram aumento (Figura 16 – C e D), demonstrando que os tratamentos estimularam as defesas antioxidantes simultaneamente.

Em relação ao dano proteico, observa-se que os grupos SA, SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs e GNPs + L apresentaram diminuição nos níveis de carbonil em relação ao grupo não tratado (Figura 13 – A), o que indica a redução dos danos causados pelo veneno. Silveira et al, 2016a encontraram resultados similares ao utilizar a fotobiomodulação (dose de 3 J/cm²) para tratar uma lesão provocada no músculo gastrocnêmio de ratos. No período de 2h e 12h após o dano tecidual, quando a fotobiomodulação foi aplicada, os animais apresentaram uma redução na média de carbonilação de proteínas. Neste estudo, os níveis de carbonil foram avaliados apenas uma vez, ao final do tratamento, devido à grande quantidade de animais que já foi necessária para a contemplação das diversas combinações terapêuticas propostas. Porém, supõe-se que os benefícios dos tratamentos tenham ocorrido desde os primeiros dias de aplicação, uma vez que a literatura já demonstra os benefícios da fotobiomodulação a curto prazo, como citado acima.

O grupo SA + U apresentou aumento nos níveis de carbonil quando comparado ao grupo que recebeu tratamento padrão (Figura 13 – C). Entretanto, este mesmo grupo apresentou aumento nos níveis de antioxidantes, bem como o grupo SA + GNPs + U, quando comparados ao tratamento padrão e ao grupo não tratado (Figura 16 C e D). Portanto, sugere-se que esses tratamentos podem reduzir os danos oxidativos a longo prazo, uma vez que há esse estímulo do sistema antioxidante.

Os tratamentos que apresentaram melhores resultados referentes à produção de oxidantes, dano oxidativo e sistema antioxidantes estão discriminados na tabela abaixo:

Tabela 68. Resumo dos resultados das análises bioquímicas de oxidantes, dano oxidativo e antioxidantes

Análise bioquímica	Órgão analisado	Combinações terapêuticas com os melhores resultados
↓ Produção de EROs	M. gastrocnêmio Coração Rins	Não houve resultados com diferença significativa
↓ Dano oxidativo	M. gastrocnêmio	# * SA + U
	Coração	# SA + L; GNPs; SA + U; * SA + U
	Rins	* SA; SA + GNPs; SA + GNPs + L; GNPs; GNPs + L
↑ Antioxidantes	M. gastrocnêmio	# SA + GNPs + L; GNPs; SA + L; SA + L + GNPs; L; SA + U; GNPs * SA + L; SA + L + GNPs; SA + U; GNPs
	Coração	# SA + L; SA + GNPs + L; SA + GNPs; GNPs; SA + U; SA + GNPs + U * SA + U; SA + GNPs + U
	Rins	# SA + U; SA + GNPs + U * SA + GNPs + U

refere-se às combinações terapêuticas que alcançaram diferença significativa quando comparados aos grupos submetidos ao tratamento padrão; * refere-se às combinações terapêuticas que alcançaram diferença significativa quando comparados ao grupo não tratado. GNPs: nanopartículas de ouro; L: laser; U: ultrassom; SA: soro antibotrópico.

Da mesma forma que o observado nos resultados relacionados à histologia do músculo gastrocnêmio (Tabela 2), pode-se notar a prevalência das GNPs nas combinações terapêuticas que apresentaram melhores resultados nas análises bioquímicas.

A resposta inflamatória e o estresse oxidativo causado pelo dano muscular podem levar a mudanças estruturais (Haupenthal et al., 2020). Durante e após a injeção, o veneno atinge os tecidos adjacentes devido ao potencial dos seus componentes que podem levar ao desenvolvimento de sequelas permanentes. Embora o músculo esquelético tenha considerável

capacidade regenerativa, o processo é lento, especialmente em decorrência da ação potente do veneno, o que pode resultar em algum grau de comprometimento funcional (Alves, Fernandes, Deana, et al, 2014c). Portanto, é notável que a abordagem com combinações terapêuticas que promovam o controle e a recuperação desse processo deletério provocado pelo veneno botrópico possam ser uma opção para melhorar o processo de recuperação das vítimas de envenenamento.

Analisando os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 fica evidenciado que em pelo menos algum parâmetro, mesmo em diferentes intensidades, as combinações terapêuticas de uma forma geral ofereceram resultados promissores ao tratamento da lesão causada pelo veneno da serpente *B. jararaca*. Ao combinar os resultados das análises histológicas e bioquímicas do músculo gastrocnêmio, percebe-se uma clara predominância da presença de melhores resultados quando as GNPs foram inclusas no tratamento, seguida pelo laser e, por último, pelo ultrassom. Estes dados levam a crer que a reparação dos danos ocasionados pelo envenenamento a nível muscular pode ser beneficiada por tratamentos que incluam as GNPs. No que se refere às análises dos resultados bioquímicos do coração e dos rins, também predominam as combinações envolvendo GNPs, seguido dos agentes eletrofísicos – laser e ultrassom – demonstrando o efeito sistêmico da combinação desses tratamentos.

De uma forma geral, os resultados obtidos com este estudo demonstram que os as combinações terapêuticas GNPs, L, GNPs + L, GNPs + U, SA + L, SA + GNPs, SA + GNPs + L e GNPs + U apresentaram os melhores resultados nas análises histológicas. Ademais, os grupos SA + U, SA + L, GNPs, SA + U, SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs + L, L e SA + GNPs + U foram os que demonstraram os melhores resultados referentes às análises bioquímicas e podem auxiliar na recuperação da lesão causada pela *B. jararaca*, diminuindo o tempo de recuperação da lesão, devendo ser consideradas como uma opção para um tratamento conjunto com o soro antiveneno.

5. CONCLUSÃO

As combinações terapêuticas propostas neste estudo para o tratamento da lesão causada pela *Bothrops jaracaca* apresentaram resultados promissores observados através de análises histológicas e bioquímicas. Destacam-se, especialmente, as combinações incluindo GNPs, que promoveram os melhores resultados. Em relação às análises histológicas, realizadas no músculo gastrocnêmio, as combinações terapêuticas que apresentaram os melhores resultados no que se refere ao estímulo da angiogênese foram GNPs + U e GNPs + L. Os grupos de tratamento GNPs, SA + GNPs, SA + L + GNPs, GNPs e L apresentaram redução na média do infiltrado inflamatório. A média de fibroblastos foi estimulada pelos grupos SA + GNPs + L, GNPs e GNPs + U. Os grupos SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNP, GNP + L, L e GNPs + U apresentaram aumento na média do percentual de compactação de colágeno.

Referente às análises bioquímicas realizadas no músculo gastrocnêmio, não houve diferença significativa em relação aos níveis de EROs em nenhum tratamento proposto; o grupo que apresentou redução de dano oxidativo foi SA + U; e os grupos SA + GNPs + L, GNPs, SA + L, L e SA + U foram responsáveis pelo aumento da produção de antioxidantes.

As análises bioquímicas no coração também não demonstraram diferença significativa nos níveis de EROs; houve redução de dano oxidativo nos grupos SA + L, GNPs e SA + U; os grupos SA + L, SA + GNPs + L, SA + GNPs, GNPs, SA + U e SA + GNPs + U apresentaram aumento nos níveis de antioxidantes.

Em relação às análises bioquímicas nos rins, assim como nos outros órgãos, não houve diferença significativa nos níveis de EROs; os grupos SA, SA + GNPs, SA + GNPs + L, GNPs e GNPs + L apresentaram redução de dano oxidativo; os grupos de tratamento SA + U, SA + GNPs + U apresentaram aumento nos níveis de antioxidantes.

Assim, diante de promissores resultados, enfatiza-se a importância da continuidade do desenvolvimento dos estudos relacionados a opções coadjuvantes ao tratamento com o soro antiveneno, buscando tornar possível e acessível sua aplicação na prática clínica, promovendo um melhor prognóstico para as vítimas do envenenamento botrópico.

REFERÊNCIAS

Abreu, L. C. De, Bernarde, P. S., & Mota da Silva, A. (2015). ACCIDENTS WITH POISONOUS ANIMALS IN BRAZIL BY AGE AND SEX. *Journal of Human Growth and Development*, 25(1), 54–62.

Adstrum, S., Hedley, G., Schleip, R., Stecco, C., & Yucesoy, C. A. (2017). Defining the fascial system. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 21(1), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2016.11.003>

Adukauskiene, D., Varanauskienė, E., & Adukauskaitė, A. (2011). Continuing medical education. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 101(4), 281–283. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1994.tb13609.x>

Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W., & Markesbery, W. R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 103(2), 373–383. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00580-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00580-7)

Albuquerque, P. L. M. M., Paiva, J. H. H. G. L., Martins, A. M. C., Meneses, G. C., Da Silva, G. B., Buckley, N., & Daher, E. D. F. (2020). Clinical assessment and pathophysiology of Bothrops venom-related acute kidney injury: A scoping review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0076>

Alfredo, P. P., Anaruma, C. A., Pião, A. C. S., João, S. M. A., & Casarotto, R. A. (2009). Effects of phonophoresis with Arnica montana onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics*, 49(4–5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2008.12.002>

Alves, A. N., Fernandes, K. P. S., Deana, A. M., Bussadori, S. K., & Mesquita-Ferrari, R. A. (2014). Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: A systematic review. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 93(12), 1073–1085. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000000158>

Alves, A. N., Fernandes, K. P. S., Melo, C. A. V., Yamaguchi, R. Y., França, C. M., Teixeira, D. F., Bussadori, S. K., Nunes, F. D., & Mesquita-Ferrari, R. A. (2014). Modulating effect of

low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers in Medical Science*, 29(2), 813–821. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1428-9>

Alves, Fernandes, K. P. S., Deana, A. M., Bussadori, S. K., & Mesquita-Ferrari, R. A. (2014c). Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: A systematic review. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 93(12), 1073–1085. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000000158>

Amaral, C. F. S., Rezende, N. A. de, Silva, O. A. da, Ribeiro, M. M. F., Magalhães, R. A., Reis, R. J. dos, Carneiro, J. G., & Castro, J. R. S. (1986). Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28(4), 220–227. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651986000400003>

Arnold, F., & West, D. C. (1991). Angiogenesis in wound healing. *Pharmacology and Therapeutics*, 52(3), 407–422. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90034-J](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90034-J)

Arunachalam, K. D., Arun, L. B., Annamalai, S. K., & Arunachalam, A. M. (2014). Potential anticancer properties of bioactive compounds of *Gymnema sylvestre* and its biofunctionalized silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 31–41. <https://doi.org/10.2147/IJN.S71182>

Assis, L., Moretti, A. I. S., Abrahão, T. B., De Souza, H. P., Hamblin, M. R., & Parizotto, N. A. (2013). Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers in Medical Science*, 28(3), 947–955. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1183-3>

Avni, D., Levkovitz, S., Maltz, L., & Oron, U. (2005). Protection of skeletal muscles from ischemic injury: Low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23(3), 273–277. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.273>

Baba, S. P., & Bhatnagar, A. (2018). Role of thiols in oxidative stress. In *Current Opinion in Toxicology* (Vol. 7, pp. 133–139). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>

Baldo, C., Tanjoni, I., León, I. R., Batista, I. F. C., Della-Casa, M. S., Clissa, P. B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G. P., Rodrigues, V. M., Perales, J., Valente, R. H., & Moura-da-Silva, A. M. (2008). BnPI, a novel P-I metalloproteinase from

Bothrops neuwiedi venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, 51(1), 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.005>

Baliyan, V., Tajmir, S., Hedgire, S. S., Ganguli, S., & Prabhakar, A. M. (2016). Lower extremity venous reflux. In *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* (Vol. 6, Issue 6, pp. 533–543). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/cdt.2016.11.14>

Bannister, J. V., & Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, 32, 279–312. <https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>

BarathManiKanth, S., Kalishwaralal, K., Sriram, M., Pandian, S. B. R. K., Youn, H. seop, Eom, S. H., & Gurunathan, S. (2010). Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-16>

Battellino, C., Piazza, R., Da Silva, A. M. M., Cury, Y., & Farsky, S. H. P. (2003). Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by Bothrops jararaca snake venom. *Toxicon*, 41(5), 583–593. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00389-6)

Bernarde, P. S. (2014). Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. *Anolis Books*, 223.

Bjarnason, J. B., & Fox, J. W. (1994). *Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms*. 62, 325–372.

Bochner, R., Fiszon, J. T., & Machado, C. (2014). A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. *Journal of Clinical Toxicology*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000194>

Bot, I., Velden, D. van der, Bouwman, M., Kröner, M. J., Kuiper, J., Quax, P. H. A., & de Vries, M. R. (2020). Local Mast Cell Activation Promotes Neovascularization. *Cells*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030701>

Cedro, R. C. A., Menaldo, D. L., Costa, T. R., Zoccal, K. F., Sartim, M. A., Santos-Filho, N. A., Faccioli, L. H., & Sampaio, S. V. (2018). Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom Suely V. Sampaio, Eliane C. Arantes, Marco A. Sartim. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0170-y>

- Chae, S. Y., Lee, M., Kim, S. W., & Bae, Y. H. (2004). Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*, *25*(5), 843–850. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00605-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00605-7)
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 12, pp. 826–837). <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chillo, O., Kleinert, E. C., Lautz, T., Lasch, M., Pagel, J. I., Heun, Y., Troidl, K., Fischer, S., Caballero-Martinez, A., Mauer, A., Kurz, A. R. M., Assmann, G., Rehberg, M., Kanse, S. M., Nieswandt, B., Walzog, B., Reichel, C. A., Mannell, H., Preissner, K. T., & Deindl, E. (2016). Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Reports*, *16*(8), 2197–2207. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.040>
- Chung, H., Dai, T., Sharma, S. K., Huang, Y.-Y., Carroll, J. D., & Hamblin, M. R. (2013). *The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy Hoon*. *40*(2), 516–533. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>.The
- Clissa, P. B., Laing, G. D., Theakston, R. D. G., Mota, I., Taylor, M. J., & Moura-da-Silva, A. M. (2001). The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*, *39*(10), 1567–1573. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00131-3)
- Clissa, P. B., Lopes-Ferreira, M., Della-Casa, M. S., Farsky, S. H. P., & Moura-da-Silva, A. M. (2006). Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. *Toxicon*, *47*(5), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.001>
- Costa, H. C., & Bérnils, R. S. (2018). Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. *Revista Herpetologia Brasileira*, *7*(1), 11–57.
- Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D. L., Vivas-Ruiz, D. E., Yarlequé, A., Sanchez, E. F., Chávez-Olórtegui, C., & Braga, V. M. M. (2019). L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37435-4>

Cressoni, M. D. C., Giusti, H. H. K. D., Casarotto, R. A., & Anaruma, C. A. (2008). The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomedicine and Laser Surgery*, 26(5), 461–466. <https://doi.org/10.1089/pho.2007.2150>

Cruz-Montecinos, C., González Blanche, A., López Sánchez, D., Cerda, M., Sanzana-Cuche, R., & Cuesta-Vargas, A. (2015). In vivo relationship between pelvis motion and deep fascia displacement of the medial gastrocnemius: Anatomical and functional implications. *Journal of Anatomy*, 227(5), 665–672. <https://doi.org/10.1111/joa.12370>

Csapo, R., Gumpenberger, M., & Wessner, B. (2020). Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00253>

Cunha, F. Q., Poole, S., Lorenzetti, B. B., & Ferreira, S. H. (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, 107(3), 660–664. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb14503.x>

da Rocha, F. R., Hauptenthal, D. P. dos S., Zaccaron, R. P., Corrêa, M. E. A. B., Tramontin, N. dos S., Fonseca, J. P., Nesi, R. T., Muller, A. P., Pinho, R. A., Paula, M. M. da S., & Silveira, P. C. L. (2019). Therapeutic effects of iontophoresis with gold nanoparticles in the repair of traumatic muscle injury. *Journal of Drug Targeting*, 28(3), 307–319. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1652617>

da Silva Aguiar, W., da Costa Galizio, N., Sant’Anna, S. S., Silveira, G. P. M., de Souza Rodrigues, F., Grego, K. F., de Morais-Zani, K., & Tanaka-Azevedo, A. M. (2020). Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. *Toxicon*, 186(July), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.030>

da Silva, W. R. G. B., de Siqueira Santos, L., Lira, D., de Oliveira Luna, K. P., Fook, S. M. L., & Alves, R. R. da N. (2023). Who are the most affected by Bothrops snakebite envenoming in Brazil? A Clinical-epidemiological profile study among the regions of the country. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(10), e0011708. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011708>

Dalmau-Pastor, M., Fargues-Polo, B., Casanova-Martínez, D., Vega, J., & Golanó, P. (2014). Anatomy of the triceps surae: A pictorial essay. In *Foot and Ankle Clinics* (Vol. 19, Issue 4, pp. 603–635). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2014.08.002>

- Darweesh, R. S., Ayoub, N. M., & Nazzal, S. (2019). Gold nanoparticles and angiogenesis: Molecular mechanisms and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 7643–7663. <https://doi.org/10.2147/IJN.S223941>
- Davies, L. C., & Taylor, P. R. (2015). Tissue-resident macrophages: Then and now. *Immunology*, *144*(4), 541–548. <https://doi.org/10.1111/imm.12451>
- De Freitas, L. F., & Hamblin, M. R. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, *22*(3), 348–364. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
- Dias da Silva, G., da Paixão Seva, A., Lessa Silva, F., Mota Sena de Oliveira, G., Machado Deorce, D., de Jesus da Costa Junior, N., & Alzamora Filho, F. (2023). Clinical effects of combined red and infrared wavelengths in the treatment of local injuries caused by Bothrops leucurus snake venom. *Toxicon*, *225*(February). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107055>
- Dong, J., Sulik, K. K., & Chen, S. (2010). The Role of NOX Enzymes in Ethanol-induced Oxidative Stress and Apoptosis in Mouse Embryos. *Bone*, *193*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.012>.The
- Dort, J., Fabre, P., Molina, T., & Dumont, N. A. (2019). Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. In *Stem Cells International* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4761427>
- Draper, D. O., Edvalson, C. G., Knight, K. L., Eggett, D., & Shurtz, J. (2010). Temperature Increases in the Human Achilles Tendon During Ultrasound Treatments With Commercial Ultrasound Gel and Full-Thickness and Half-Thickness Gel Pads. *Journal of Athletic Training*, *45*(4), 333–337. http://meridian.allenpress.com/jat/article-pdf/45/4/333/1455436/1062-6050-45_4_333.pdf
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, *82*(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J., & Bailey, A. J. (1977). The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Letters*, *79*(2), 248–252. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80797-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80797-7)
- Dufaux, B., & Order, U. (1989). Complement activation after prolonged exercise. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 179).

- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. In *Nature Medicine* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1391–1401). <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Enoksson, M., Lyberg, K., Möller-Westerberg, C., Fallon, P. G., Nilsson, G., & Lunderius-Andersson, C. (2011). Mast Cells as Sensors of Cell Injury through IL-33 Recognition. *The Journal of Immunology*, *186*(4), 2523–2528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003383>
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., & Gutiérrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*, *74*(9), 1781–1794. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026>
- Fantinati, M. S., Mendonça, D. E. O., Fantinati, A. M. M., dos Santos, B. F., Reis, J. C. O., Afonso, C. L., Vinaud, M. C., & Lino Júnior, R. D. S. (2016). Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, *31*(7), 463–471. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160070000006>
- Farias, I. B. de, Morais-Zani, K. de, Serino-Silva, C., Sant’Anna, S. S., Rocha, M. M. T. da, Grego, K. F., Andrade-Silva, D., Serrano, S. M. T., & Tanaka-Azevedo, A. M. (2018). Functional and proteomic comparison of Bothrops jararaca venom from captive specimens and the Brazilian Bothropic Reference Venom. *Journal of Proteomics*, *174*(October 2017), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.12.008>
- Feitosa, E. L., Sampaio, V. S., Salinas, J. L., Queiroz, A. M., Da Silva, I. M., Gomes, A. A., Sachett, J., Siqueira, A. M., Ferreira, L. C. L., Dos Santos, M. C., Lacerda, M., Monteiro, W., & Gutiérrez, J. M. (2015). Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132237>
- Ferraz, C. R., Calixto-Campos, C., Manchope, M. F., Casagrande, R., Clissa, P. B., Baldo, C., & Verri, W. A. (2015). Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF κ B in mice. *Toxicon*, *103*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.024>
- Ferreira, J. F., Albuquerque, A. L. H., Amorim, R. M., Ferreira, R. S., Takahira, R. K., Borges, A. S., & Oliveira-Filho, J. P. (2020). Clinical and Therapeutic Aspects of Brazilian Native Bothrops Envenomation in Nine Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, *94*, 103245. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103245>

- Forcina, L., Cosentino, M., & Musarò, A. (2020). Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. In *Cells* (Vol. 9, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9051297>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, *45*(8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2008). Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*, *275*(12), 3016–3030. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>
- França, F. O. S., Barbaro, K. C., T, H. W. F., Cardoso, J. L. C., Sano-Martins, I. S., Tomy, S. C., Lopes, M. H., Warrel, D. A., & Theakston G, R. D. (2003a). *Envenoming by Bothrops jararaca in Brazil: association between venom antigenaemia and severity at admission to hospital*. 312–317.
- Franco, A. T. B., Silva, L. M. G., Costa, M. S., Zamuner, S. F., Vieira, R. P., de Fatima Pereira Teixeira, C., & Zamuner, S. R. (2016). Effect of photobiomodulation on endothelial cell exposed to Bothrops jararaca venom. *Lasers in Medical Science*, *31*(5), 1017–1025. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1941-8>
- Frangogiannis, N. G., Lindsey, M. L., Michael, L. H., Youker, K. A., Bressler, R. B., Mendoza, L. H., Spengler, R. N., Smith, ; C Wayne, & Entman, M. L. (1998). *Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF-, Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion*. <http://ahajournals.org>
- Freitas-de-Sousa, L. A., Colombini, M., Lopes-Ferreira, M., Serrano, S. M. T., & Moura-da-Silva, A. M. (2017). *Insights into the Mechanisms Involved in Strong Hemorrhage and Dermonecrosis Induced by Atroxlysin-Ia, a PI-Class Snake Venom Metalloproteinase*.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., & Rotello, V. M. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>

Gillies, A. R., & Lieber, R. L. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. In *Muscle and Nerve* (Vol. 44, Issue 3, pp. 318–331). <https://doi.org/10.1002/mus.22094>

Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 95–112). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>

Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>

Gutiérrez, J. M., León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., & Chaves, F. (1998). Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 36(11), 1529–1538. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00145-7)

Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82(9–10), 841–850. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9)

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>

Gutiérrez, J. M., Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2006). *Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership*. 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>

Han, R., Frett, E. M., Levy, J. R., Rader, E. P., Lueck, J. D., Bansal, D., Moore, S. A., Ng, R., De Bernabé, D. B. V., Faulkner, J. A., & Campbell, K. P. (2010). Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4366–4374. <https://doi.org/10.1172/JCI42390>

Hauptenthal, D. P. dos S., Dias, F. M., Zaccaron, R. P., Silveira, G. de B., Corrêa, M. E. A. B., Mendes, C., Casagrande, L. de R., Pinho, R. A., de Andrade, T. A. M., Feuser, P. E., Paula, M. M. da S., & Silveira, P. C. L. (2020). Effects of phonophoresis with ibuprofen associated with gold nanoparticles in animal model of traumatic muscle injury. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 143, 105120. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105120>

Haupenthal, D. P. dos S., Possato, J. C., Zaccaron, R. P., Mendes, C., Rodrigues, M. S., Nesi, R. T., Pinho, R. A., Feuser, P. E., Machado-de-Ávila, R. A., Comim, C. M., & Silveira, P. C. L. (2019). Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice. *Journal of Drug Targeting*, *0*(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1613408>

Haupenthal, D. P., Zortea, D., Zaccaron, R. P., de Bem Silveira, G., Corrêa, M. E. A. B., Mendes, C., de Roch Casagrande, L., Duarte, M. B., Pinho, R. A., Feuser, P. E., Machado-de-Ávila, R. A., & Silveira, P. C. L. (2020). Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. *Materials Science and Engineering C*, *110*(January), 110681. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110681>

He, Z., Ma, C., Yu, T., Song, J., Leng, J., Gu, X., & Li, J. (2019). Activation mechanisms and multifaceted effects of mast cells in ischemia reperfusion injury. In *Experimental Cell Research* (Vol. 376, Issue 2, pp. 227–235). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.022>

Homma, M., & Tu, A. T. (1971). Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *British Journal of Experimental Pathology*, *52*(5), 538–542.

Järvinen, T. A. H., Järvinen, T. L. N., Kääriäinen, M., Äärimaa, V., Vaittinen, S., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2007). Muscle injuries: optimising recovery. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, *21*(2), 317–331. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2006.12.004>

Järvinen, T. A. H., Järvinen, T. L. N., Kääriäinen, M., Kalimo, H., & Järvinen, M. (2005). Muscle injuries: Biology and treatment. *American Journal of Sports Medicine*, *33*(5), 745–764. <https://doi.org/10.1177/0363546505274714>

Juban, G., & Chazaud, B. (2021). Efferocytosis during skeletal muscle regeneration. In *Cells* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10123267>

Kamiguti, A. S., Cardoso, J. L. C., Theakston, R. D. G., Sano-Martins, I. S., Hutton, R. A., Rugman, F. P., Warrell, D. A., & Hay, C. R. M. (1991). Coagulopathy and haemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. *Toxicon*, *29*(8), 961–972. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90079-7)

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., & Zuzel, M. (1996). Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochemical Journal*, *320*(2), 635–641. <https://doi.org/10.1042/bj3200635>

Kamiguti, A. S., Slupsky, J. R., Zuzel, M., & Hay, C. R. M. (1994). Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thrombosis and Haemostasis*, *72*(2), 244–249. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1648847>

Kanazawa, Y., Miyachi, R., Higuchi, T., & Sato, H. (2023). Effects of Aging on Collagen in the Skeletal Muscle of Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713121>

Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R. K., Singh, T. P., & Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, *278*(23), 4544–4576. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>

Kawanishi, N., Mizokami, T., Niihara, H., Yada, K., & Suzuki, K. (2016). Neutrophil Depletion Attenuates Muscle Injury after Exhaustive Exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *48*(10), 1917–1924. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000980>

Kim, J. E., Lee, J., Jang, M., Kwak, M. H., Go, J., Kho, E. K., Song, S. H., Sung, J. E., Lee, J., & Hwang, D. Y. (2015). Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *Biomaterials Science*, *3*(3), 509–519. <https://doi.org/10.1039/c4bm00390j>

Kudsi, S. Q., Antoniazzi, C. T. de D., Camponogara, C., Brum, E. da S., Brusco, I., Peres, D. S., Fischer, S. P. M., Dalenogare, D. P., Stein, C. dos S., Zaccaron, R. P., Silveira, P. C. L., Moresco, R. N., Oliveira, S. M., & Trevisan, G. (2020). Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats. *European Journal of Pharmacology*, *883*(July), 173284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173284>

Laing, G. D., Clissa, P. B., Theakston, R. D. G., Moura-da-Silva, A. M., & Taylor, M. J. (2003). Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *European Journal of Immunology*, *33*(12), 3458–3463. <https://doi.org/10.1002/eji.200324475>

- Laing, G. D., & Moura-Da-Silva, A. M. (2005). Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, 45(8), 987–996. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.013>
- Lakyová, L., Toporcer, T., Tomeckova, V., Sabo, J., & Radonak, J. (1959). Low-Level Laser Therapy for Protection Against Skeletal Muscle Damage After Ischemia - Reperfusion Injury in Rat Hindlimbs. *Nucl. Phys.*, 13(1), 104–116.
- Lau, Bidin, N., Islam, S., Shukri, W. N. B. W. M., Zakaria, N., Musa, N., & Krishnan, G. (2017). Influence of gold nanoparticles on wound healing treatment in rat model: Photobiomodulation therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 49(4), 380–386. <https://doi.org/10.1002/lsm.22614>
- Legoedec, J., Gasque, Phil., Scotte, J. M. & Fontalne, M. (1997). Complement classical pathway expression by human skeletal myoblasts *in vitro* (Vol. 34).
- Leu, J. G., Chen, S. A., Chen, H. M., Wu, W. M., Hung, C. F., Yao, Y. Der, Tu, C. S., & Liang, Y. J. (2012). The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(5), 767–775. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.08.013>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, 186. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(79\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0049-0172(79)90003-9)
- Light, N., & Champion, A. E. (1984). Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium coliagens. In *Biochem. J* (Vol. 219).
- Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderón, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42(8), 885–901. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008>
- Lopez-Chaves, C., Soto-Alvaredo, J., Montes-Bayon, M., Bettmer, J., Llopis, J., & Sanchez-Gonzalez, C. (2018). Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.011>

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Luca, M. De, Ward, C. M., Ohmori, K., Andrews, R. K., & Berndt, M. C. (1995). *Jararhagin and Jaracetin: Novel Snake Venom Inhibitors of the Integrin Collagen Receptor, $\alpha 2\beta 1$* (pp. 570–576).
- Maia Filho, A. L. M., Villaverde, A. B., Munin, E., Aimbire, F., & Albertini, R. (2010). Comparative Study of the Topical Application of Aloe Vera Gel, Therapeutic Ultrasound and Phonophoresis on the Tissue Repair in Collagenase-Induced Rat Tendinitis. *Ultrasound in Medicine and Biology*, *36*(10), 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.012>
- Mann, C. J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A. L., & Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. In *Skeletal Muscle* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-21>
- McKee, T. J., Perlman, G., Morris, M., & Komarova, S. V. (2019). Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46896-0>
- Merrick, M. A., Mihalyov, M. R., Roethemeier, J. L., Cordova, M. L., & Ingersoll, C. D. (2002). A Comparison of Intramuscular Temperatures During Ultrasound Treatments With Coupling Gel or Gel Pads. In *J Orthop Sports Phys Ther*. www.jospt.org
- Ministério da saúde do Brasil. (2001). Acidentes por Lepidópteros. In *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*.
- Mitragotri, S., & Kost, J. (2004). Low-frequency sonophoresis: A review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(5), 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.024>
- Molina Molina, D. A., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D. L., Costal-Oliveira, F., Ávila, G. R. de, Soccol, V. T., Machado-de-Ávila, R. A., & Chávez-Olórtegui, C. (2018). Identification of a linear B-cell epitope in the catalytic domain of bothropasin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom. *Molecular Immunology*, *104*(August), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.10.019>

Mota, S. M. B., Albuquerque, P. L. M. M., Meneses, G. C., da Silva Junior, G. B., Martins, A. M. C., & De Francesco Daher, E. (2021). Role of endothelial biomarkers in predicting acute kidney injury in Bothrops envenoming. *Toxicology Letters*, *345*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.04.010>

Moura-da-Silva, A., Butera, D., & Tanjoni, I. (2007). Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, *13*(28), 2893–2905. <https://doi.org/10.2174/138161207782023711>

Moura-da-Silva, A. M., & Baldo, C. (2012). Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from Bothrops jararaca. *Toxicon*, *60*(3), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.026>

Moura-da-Silva, A. M., Marcinkiewicz, C., Marcinkiewicz, M., & Niewiarowski, S. (2001). Selective recognition of $\alpha 2\beta 1$ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from Bothrops jararaca venom. *Thrombosis Research*, *102*(2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00216-X](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00216-X)

Moura-da-Silva, A. M., Ramos, O. H. P., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J. S., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M. S., Tanjoni, I., Clissa, P. B., Fernandes, I., Chudzinski-Tavassi, A. M., & Eble, J. A. (2008). Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*, *90*(3), 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.11.009>

Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Wang, P., Wang, L., Basu, S., Nagy, J. A., Atala, A., Mukhopadhyay, D., & Soker, S. (2005). Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, *11*(9), 3530–3534. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2482>

Musarò, A. (2014). The Basis of Muscle Regeneration. *Advances in Biology*, *2014*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/612471>

Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M., Duque, E., Rodríguez, O., Luis Arango, J., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., María Rodríguez, L., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Mariano Gómez, L., Luis Uribe, F., Cárdenas, S., Núñez, V., & Díaz, A. (2002). Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological

study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40(8), 1107–1114. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00104-6)

Othman, E. M., Hamada, H. A., Mohamed, G. I., Abdallah, G. A., Ahmed, Z. S., Al-Shenqiti, A. M., & Kadry, A. M. (2023). Clinical and histopathological responses to bee venom phonophoresis in treating venous and diabetic ulcers: a single-blind randomized controlled trial. *Frontiers in Medicine*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1085544>

Paine, M. J. I., Desmond, H. P., David, R., Theakstons, G., & Crampton, J. M. (1992). Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from Bothrops jararaca Venom. *J Biol Chem*, 267(32), 22869–22876.

Park, N. J., Allen, L., & Driver, V. R. (2013). Updating on understanding and managing chronic wound. *Dermatologic Therapy*, 26(3), 236–256. <https://doi.org/10.1111/dth.12052>

Pascual Huerta, J. (2014). The effect of the gastrocnemius on the plantar fascia. In *Foot and Ankle Clinics* (Vol. 19, Issue 4, pp. 701–718). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2014.08.011>

Pierce, A., & Pittet, J. F. (2014). Inflammatory response to trauma: Implications for coagulation and resuscitation. In *Current Opinion in Anaesthesiology* (Vol. 27, Issue 2, pp. 246–252). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000047>

Pinho, F., & Pereira, I. (2001). *Ofidismo* (pp. 24–29).

Pinho, R. A., Hauptenthal, D. P. S., Fauser, P. E., Thirupathi, A., & Silveira, P. C. L. (2022). Gold Nanoparticle-Based Therapy for Muscle Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of Inflammation Research*, 15(May), 3219–3234. <https://doi.org/10.2147/JIR.S327292>

Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Queiroz, L. S., Santo Neto, H., Assakura, M. T., Reichl, A. P., & Mandelbaum, F. R. (1985). Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from Bothrops jararaca snake venom. *Toxicon*, 23(2), 341–345. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90158-](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90158-8)

- Rhode, A. C., Lavelle, L. M., & Berry, D. C. (2019). Efficacy of ReBounce diathermy as a thermal heating agent: A critically appraised topic. *Journal of Sport Rehabilitation*, 28(6), 656–659. <https://doi.org/10.1123/JSR.2018-0034>
- Rô Me Frenette, J., Cai, B., & Tidball, J. G. (n.d.). *Complement Activation Promotes Muscle Inflammation during Modified Muscle Use*.
- Robertson, V. J., & Baker, K. G. (2001). A Review of Therapeutic Ultrasound : *Physical Therapy*, 81(7), 1339–1350.
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. In *Immune Network* (Vol. 18, Issue 4). Korean Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M., & Gutiérrez, J. M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. In *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 63, Issue 3, pp. 186–199). <https://doi.org/10.1006/exmp.1995.1042>
- Saliba, S., Mistry, D. J., Perrin, D. H., Gieck, J., & Weltman, A. (2007). Phonophoresis and the absorption of dexamethasone in the presence of an occlusive dressing. *Journal of Athletic Training*, 42(3), 349–354. [https://doi.org/10.1016/s0162-0908\(08\)79275-4](https://doi.org/10.1016/s0162-0908(08)79275-4)
- Salvador, G. H. M., Cardoso, F. F., Gomes, A. A., Cavalcante, W. L. G., Gallacci, M., & Fontes, M. R. M. (2019). Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A2-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36839-6>
- Sand, J. M. B., Genovese, F., Gudmann, N. S., & Karsdal, M. A. (2019). Type IV collagen. In *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817068-7.00004-5>
- Sanes, J. R. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 278, Issue 15, pp. 12601–12604). <https://doi.org/10.1074/jbc.R200027200>
- Sciorati, C., Rigamonti, E., Manfredi, A. A., & Rovere-Querini, P. (2016). Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 23, Issue 6, pp. 927–937). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.171>

Seals, D. F., & Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes and Development*, *17*(1), 7–30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>

Shah, M., Badwaik, V., Kherde, Y., Waghvani, H. K., Modi, T., & Aguilar, Z. P. (2014). *Table of contents I*. *8*, 1320–1344.

Shefer, G., Barash, I., Oron, U., & Halevy, O. (2003). Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1593*(2–3), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00350-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00350-6)

Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer*, *2*(12), 1097–1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>

Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 78, pp. 929–958). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

Silva, R. O. S., Duarte, M. C., Oliveira Junior, C. A., de Assis, R. A., Lana, A. M. Q., & Lobato, F. C. F. (2018). Comparison of humoral neutralizing antibody response in rabbits, guinea pigs, and cattle vaccinated with epsilon and beta toxoids from *Clostridium perfringens* and *C. botulinum* types C and D toxoids. *Anaerobe*, *54*, 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.014>

Silveira, P. C. L., Scheffer, D. D. L., Glaser, V., Remor, A. P., Pinho, R. A., Aguiar Junior, A. S., & Latini, A. (2016a). Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radical Research*, *50*(5), 503–513. <https://doi.org/10.3109/10715762.2016.1147649>

Silveira, P. C. L., Victor, E. G., Notoya, F. D. S., Scheffer, D. D. L., Silva, L. Da, Cantú, R. B., Martínez, V. H. C., De Pinho, R. A., & Paula, M. M. D. S. (2016b). Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. *Drug Delivery*, *23*(3), 926–932. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.923063>

Simões Ribeiro, M., Teixeira Da Silva, D. D. F., Nabuco De Araújo, C. E., De Oliveira, S. F., Raspantini Pelegrini, C. M., Tenório Zorn, T. M., & Zzell, D. M. (2004). Effects of Low-

Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, 22(1), 59–66. <https://doi.org/10.1089/104454704773660994>

Soares Lima, T., Silva de Oliveira, M. S., Reis, A. V. F., Petrilli, R., & Eloy, J. O. (2023). Nanoencapsulation of Methylene-Blue for Enhanced Skin Cancer Cell Phototoxicity and Cutaneous Penetration in Association with Sonophoresis. *Pharmaceutics*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051371>

Soliman, W. E., Elsewedy, H. S., Younis, N. S., Shinu, P., Elsayy, L. E., & Ramadan, H. A. (2022). Evaluating Antimicrobial Activity and Wound Healing Effect of Rod-Shaped Nanoparticles. *Polymers*, 14(13). <https://doi.org/10.3390/polym14132637>

Stecco, C., Fede, C., Macchi, V., Porzionato, A., Petrelli, L., Biz, C., Stern, R., & De Caro, R. (n.d.). *The Fasciocytes: A New Cell Devoted To Fascial Gliding Regulation*.

Sul, O. J., Kim, J. C., Kyung, T. W., Kim, H. J., Kim, Y. Y., Kim, S. H., Kim, J. S., & Choi, H. S. (2010). Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11), 2209–2213. <https://doi.org/10.1271/bbb.100375>

Sumbayev, V. V., Yasinska, I. M., Garcia, C. P., Gilliland, D., Lall, G. S., Gibbs, B. F., Bonsall, D. R., Varani, L., Rossi, F., & Calzolari, L. (2013). Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. *Small*, 9(3), 472–477. <https://doi.org/10.1002/sml.201201528>

Tang, M., Gandhi, N. S., Burrage, K., & Gu, Y. (2019). Interaction of gold nanosurfaces/nanoparticles with collagen-like peptides. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(7), 3701–3711. <https://doi.org/10.1039/c8cp05191g>

Tanjoni, I., Evangelista, K., Della-Casa, M. S., Butera, D., Magalhães, G. S., Baldo, C., Clissa, P. B., Fernandes, I., Eble, J., & Moura-da-Silva, A. M. (2010). Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to α 2 β 1 integrin and collagen. *Toxicon*, 55(6), 1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.010>

Teixeira, C. F. P., Chaves, F., Zamunér, S. R., Fernandes, C. M., Zuliani, J. P., Cruz-Hofling, M. A., Fernandes, I., & Gutiérrez, J. M. (2005). Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with Bothrops jararaca snake

venom. *International Journal of Experimental Pathology*, 86(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2005.00419.x>

Tidball, J. G. (2005a). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 288(2 57-2), 345–353. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00454.2004>

Tidball, J. G. (2005b). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 288(2 57-2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00454.2004>

Tidball, J. G. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Comprehensive Physiology*, 1(4), 2029–2062. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>

Tidball, J. G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(3), 165–178. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>

Tokarnia, C. H., & Peixoto, P. V. (2006). A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(2), 55–68. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000200001>

Toma, H. E., & Bonifácio, L. da S. (2005). Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. *Sustainability in Debate*, 2(2), 205–208. <https://doi.org/10.18472/sustdeb.v2n2.2011.5829>

Tu, H., & Li, Y. L. (2023). Inflammation balance in skeletal muscle damage and repair. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1133355>

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(c), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>

Uderhardt, S., Martins, A. J., Tsang, J. S., Lämmermann, T., & Germain, R. N. (2019). Resident Macrophages Cloak Tissue Microlesions to Prevent Neutrophil-Driven Inflammatory Damage. *Cell*, 177(3), 541-555.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.028>

Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V., Gattazzo, F., Molon, S., Grumati, P., Montemurro, F., Tedesco, F. S., Blaauw, B., Cossu, G., Vozzi, G., Rando, T. A., & Bonaldo, P. (2013).

Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2964>

Walt. (2006). Consensus agreement on the design and conduct of clinical studies with low-level laser therapy and light therapy for musculoskeletal pain and disorders. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(6), 761–762. <https://doi.org/10.1089/pho.2006.24.761>

Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. R. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 129, Issue 7, pp. 2619–2628). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>

White, J. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, 45(8), 951–967. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>

Wilkin, L. D., Merrick, M. A., Kirby, T. E., & Devor, S. T. (2004). Influence of Therapeutic Ultrasound on Skeletal Muscle Regeneration Following Blunt Contusion. *International Journal of Sports Medicine*, 25(1), 73–77. <https://doi.org/10.1055/s-2003-45234>

Williams, H. F., Mellows, B. A., Mitchell, R., Sfyri, P., Layfield, H. J., Salamah, M., Vaiyapuri, R., Collins-Hooper, H., Bicknell, A. B., Matsakas, A., Patel, K., & Vaiyapuri, S. (2019). Mechanisms underpinning the permanent muscle damage induced by snake venom metalloprotease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007041>

Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. In *Nature* (Vol. 496, Issue 7446, pp. 445–455). <https://doi.org/10.1038/nature12034>

Yang, W., & Hu, P. (2018). Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. In *Journal of Orthopaedic Translation* (Vol. 13, pp. 25–32). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>

Zein, R., Selting, W., & Hamblin, M. R. (2018). Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *Journal of Biomedical Optics*, 23(12), 1. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.12.120901>

Zhang, X., & Mosser, D. M. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. In *Journal of Pathology* (Vol. 214, Issue 2, pp. 161–178). <https://doi.org/10.1002/path.2284>

Zindel, J., & Kubes, P. (2019). *DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis>

Zügel, M., Maganaris, C. N., Wilke, J., Jurkat-Rott, K., Klingler, W., Wearing, S. C., Findley, T., Barbe, M. F., Steinacker, J. M., Vleeming, A., Bloch, W., Schleip, R., & Hodges, P. W. (2018). Fascial tissue research in sports medicine: From molecules to tissue adaptation, injury and diagnostics: Consensus statement. *British Journal of Sports Medicine*, 52(23), 1497. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099308>

Zuliani, J. P., Soares, A. M., & Gutiérrez, J. M. (2020). Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. In *Toxicon* (Vol. 187, pp. 188–197). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.09.006>

APÊNDICE A – Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



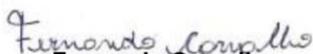
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **15/12/2020**.

Título do projeto	Utilização de nanopartículas de ouro e recursos eletroterapêuticos para o tratamento da lesão dermonecrotica causada pelo veneno da serpente Bothrops jararaca
Project title	Use of gold nanoparticles and electro-therapy resources for the treatment of dermonecrotic wound caused by snake venom Bothrops jararaca
Número do protocolo Protocol number	77/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA
Pesquisadores Researchers	Mírian Ívens Fagundes, Bruna Barros Fernandes, Daysiane de Oliveira, Gabriel Paulino Luiz, Gustavo de Bem Silveira, Jonathann Corrêa Possato, Mariana de Melo Cardoso, Nathalia Coral Galvani, Rahisa Scussel, Rubya Pereira Zaccaron,
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/01/2021 a 10/01/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / Swiss
Idade/Peso	60 dias / 18-22g
Número de animais	52 Masculino + 52 Feminino = 104
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 15 de dezembro de 2020.


Fernando Carvalho

Coordenador da CEUA

APÊNDICE B – Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **04/05/2021**.

Título do projeto	Utilização de nanopartículas de ouro e recursos eletroterapêuticos para o tratamento da lesão dermonecrotica causada pelo veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>
Project title	Use of gold nanoparticles and electro-therapy resources for the treatment of dermonecrotic wound caused by snake venom <i>Bothrops jararaca</i>
Número do protocolo Protocol number	77/2020 Adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA
Pesquisadores Researchers	Mírian Ívens Fagundes, Bruna Barros Fernandes, Daysiane de Oliveira, Gabriel Paulino Luiz, Gustavo de Bem Silveira, Jonathann Corrêa Possato, Mariana de Melo Cardoso, Nathalia Coral Galvani, Rahisa Scussel, Rubya Pereira Zaccaron,
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/01/2021 a 10/01/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / Swiss
Idade/Peso	60 dias / 18-22g
Número de animais	78 Masculino + 78 Feminino = 156
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 04 de maio de 2021

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA