

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

JUSSARA VAZ NASCIMENTO ZIEGLER

AÇÃO DO GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO NA PATOGÊNESE  
DA MIONECROSE E NA REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS  
ENVENENAMENTO BOTRÓPICO EXPERIMENTAL

Bragança Paulista - SP  
2014

JUSSARA VAZ NASCIMENTO ZIEGLER

AÇÃO DO GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO NA PATOGÊNESE  
DA MIONECROSE E NA REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS  
ENVENENAMENTO BOTRÓPICO EXPERIMENTAL

Orientadora  
Profa. Dra. Thalita Rocha

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação *Stricto sensu* da  
Universidade São Francisco para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde

Bragança Paulista - SP  
2014

QW 630.5 N4 Ziegler, Jussara Vaz Nascimento.

Z63a

Ação do Glicirrizinato Dipotássio na patogênese da mionecrose e na regeneração muscular após envenenamento botrópico experimental. / Jussara Vaz Nascimento Ziegler. -- Bragança Paulista, 2014.

52 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Thalita Rocha.

1. *Bothrops jararacussu*. 2. Citocinas. 3. Mionecrose. 4. Regeneração. I. Rocha, Thalita. II. Título.

ZIGLER, Jussara Vaz Nascimento. “**Ação do glicirrizinato dipotássio na patogênese da mionecrose e na regeneração muscular após envenenamento botrópico experimental**”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em trinta e um de julho de 2014 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



---

Profa. Dra. Thalita Rocha  
Universidade São Francisco



---

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero  
Universidade São Francisco



---

Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta  
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Thalita Rocha, pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP 2013/10163-4) pelo Auxílio Pesquisa fornecido.

Aos professores do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco de Bragança Paulista, em especial as professoras Drª Fernanda Bruschi Marinho Priviero e Drª Patrícia de Oliveira Carvalho.

À Profª Drª Maria Alice Cruz Hofling do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, por ceder o microscópio, à Profª Drª Léa Rodrigues Simioni da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, por doar o veneno e à Profª Drª Carla Collares Buzato do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, por ceder o criostato.

Aos colegas de pesquisa Marta Gracia, Thais Helena de Oliveira e Laís Nascimento, Caroline Candida de Oliveira pela amizade e dedicação nos experimentos.

Aos técnicos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Universidade São Francisco Marcia Messias e Lucio Oliveira.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação em Ciências da Saúde *Stricto Sensu*, Vilma Aparecida Tescke de Freitas e Tatine Martins de Oliveira.

Aos amigos que compartilharam momentos acadêmicos ou não, mas que farão parte da minha memória, Antonio Lisboa, Verônica Tricoli e Marcia Messias.

## RESUMO

Dentre as serpentes de importância médica no Brasil destacam-se as pertencentes ao gênero *Bothrops*. O veneno da serpente *Bothrops jararacussu* possui inúmeras substâncias que geram danos locais e sistêmicos. A soroterapia com o antiveneno é eficaz sistemicamente, mas ainda é ineficaz para minimizar, ou reverter, os efeitos locais, e por isso, terapias alternativas tem sido abordadas. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do Glicirrizinato Dipotássio (DPG) como modulador da inflamação na patogênese da mionecrose, pela marcação das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e sua ação na regeneração muscular, pela marcação das proteínas myoD e miogenina. Camundongos *Swiss* foram divididos em 4 grupos experimentais: veneno (V - 100  $\mu$ g/mL), veneno + DPG (VDPG - 1,4mg/g de peso do animal), naïve – grupo controle (N) e DPG (1,4mg/g). A aplicação do DPG ocorreu uma hora após a inoculação do veneno. Nos tempos de sobrevivência de 3 e 24 horas (fase de degeneração), 3, 7 e 21 dias (fase de regeneração) os animais foram eutanaziados. Os músculos gastrocnêmios foram dissecados, processados para criomicrotomia e imunohistoquímica. Não houve mionecrose e/ou regeneração no grupo N. A análise histológica demonstrou intenso dano muscular nos animais submetidos ao veneno após 3 e 24 horas, sendo este efeito predominantemente observado na forma de fibras hipercontraídas e células *ghost*. Após a inoculação do DPG observou-se redução na porcentagem da lesão. A marcação das citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  também foi mais fraca no grupo VDPG, sugerindo que o DPG atua na modulação da expressão destas proteínas e, conseqüentemente, no processo inflamatório durante o envenenamento. Durante a fase de regeneração, células satélites, mioblastos e miotubos foram observados nos grupos V, VDPG e DPG, sendo estes observados por marcação das proteínas myoD e miogenina. Entretanto, aos 7 e 21 dias, os eventos de reestruturação muscular são mais perceptíveis no grupo VDPG. A presença de fibras diferenciadas também no grupo DPG sugere a ação do mesmo na hiperplasia muscular, um evento importante da recomposição da histoarquitetura do tecido. Desta forma os achados deste trabalho inferem o DPG possui ação moduladora positiva na inflamação, estimula eventos celulares regenerativos, sendo um possível coadjuvante à soroterapia em uso para acidentes ofídicos.

**Palavras-chave:** envenenamento botrópico, mionecrose, regeneração muscular, inflamação, glicirrizinato dipotássio.

## ABSTRACT

Among the snakes of medical importance in Brazil the genus *Bothrops* is the most relevant. The *Bothrops jararacussu* snake venom has several substances that cause local and systemic damage. The antivenom therapy is systemically effective, but is still inefficient to minimize, or reverse, the local effects, and therefore, alternative therapies have been addressed. The objective of this study was to evaluate the effects of Dipotassium Glycyrrhizinate (DPG) as a modulator of inflammation in the pathogenesis of myonecrosis, accessing the TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines, and its action in muscle regeneration, accessing myoD and myogenin proteins. Swiss mice were divided into 4 experimental groups: venom (V - 100 mg/mL), venom + DPG (VDPG - 1.4 mg/g of body weight), naïve – control group (N) and DPG (1.4 mg/g). The i.m. DPG injection was done one hour after the venom inoculation. After the time-lives of 3 and 24 hours (degeneration phase), 3, 7 and 21 days (regeneration phase) the animals were euthanized. The gastrocnemius muscles were dissected and processed for cryomicrotomy and immunohistochemistry. There was no myonecrosis and/nor regeneration in the group N. The histological analysis showed intense muscular injury in animals subjected to the venom after 3 and 24 hours. This effect is predominantly observed as ghost cells and hipercontracted fibres. After i.m. DPG injection a reduction in the percentage of the lesion was observed. The presence of TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  cytokines was weaker in VDPG group, suggesting that DPG can modulate the expression of these proteins and therefore the inflammatory process during envenoming. During the regeneration phase, satellite cells, myoblasts and myotubes were observed in the groups V, VDPG and DPG, these being noted by the presence of myoD and myogenin protein. However, at 7 and 21 days, the events of muscle regeneration are more noticeable in VDPG group. The presence of differentiated fibres in the DPG group also suggests the action of DPG in muscle hyperplasia, an important event to restore the tissue histoarchitecture. The findings of this study infer that DPG has positive modulatory action on inflammation, stimulates regenerative cellular events, being a possible adjunct to antivenom therapy used for snakebites.

**Keywords:** *Bothrops* venom, myonecrosis, muscle regeneration, inflammation, dipotassium glycyrrhizinate

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	-	Ácido glicirrízico
ATPase	-	Adenosina trifosfatase
bHLH	-	Hélice-alça-hélice básica
CD34	-	Catepsina D-34
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX <sub>2</sub>	-	Ciclo oxigenase
DMH	-	1,2 dimetilhidrazina
DPG	-	Glicirrizinato dipotássio
FGF	-	Fator de crescimento do fibroblasto
Grupo DPG	-	Animais que receberam injeção i.m. da solução de Glicirrizinato Dipotássio (100 µl a 2%)
Grupo N	-	Animais que não receberam nenhuma injeção i.m.
Grupo V	-	Animais que receberam injeção i.m. de solução de veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> (100 µg/mL; 100 µL)
Grupo VDPG	-	Animais que receberam, após a injeção i.m. da solução de veneno, injeção i.m. de Glicirrizinato Dipotássio a 2% (100uL, 1,4mg/g do peso do animal)
HGF	-	
i.m.	-	Intramuscular
ICAM	-	Moléculas de adesão intracelular
IGF	-	Fator de crescimento do tipo insulina
IFN-γ	-	Interferon gamma
IL-1	-	Interleucina- 1
IL-6	-	Interleucina- 6
iNOS	-	Óxido nítrico sintase indusível
Ki-67	-	Marcador da proliferação celular
LD50	-	Dose letal mediana
MEC	-	Matriz extracelular

MEE	-	Músculo estriado esquelético
MHC	-	Cadeia pesada da miosina
MRF4	-	Fator de regulação miogênica 4
MRFs	-	miogênico
MS	-	Ministério da Saúde
Myf-1	-	Miogenina
Myf-3	-	Fator miogênico 3
Myf-5	-	Fator miogênico 5
Myf-6	-	Fator miogênico 6
Myo D	-	Fator de determinação miogênica 1
NAD	-	
NF-κB	-	Fator de necrose kappa B
NF-κB-p65	-	Subunidade do fator de necrose kappa B
Pax7	-	Fator de Transcrição “paired box” 7
PLA <sub>2</sub>	-	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub> D49	-	Fosfolipase A <sub>2</sub> Aspartato 49
PLA <sub>2</sub> K49	-	Fosfolipase A <sub>2</sub> Lisina 49
SBCAL	-	Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SINAN	-	Sistema de Notificação de Agravos
TGF	-	Fator de crescimento transformante
TGF-β	-	Fator de crescimento transformante beta
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral alfa
UNICAMP	-	Universidade Estadual de Campinas
VCAM-1	-	-1
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	-	Receptor do tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema representativo dos possíveis efeitos locais induzidos pelos venenos botrópicos .....	06
<b>Figura 2.</b>	Lesões locais ocasionadas por acidentes botrópicos .....	07
<b>Figura 3.</b>	Espécime adulto de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	09
<b>Figura 4.</b>	Esquema representativo da regeneração do tecido muscular estriado esquelético a partir da ativação e diferenciação das células satélites .....	11
<b>Figura 5</b>	Esquema representando a diferenciação celular e expressão gênica no músculo estriado esquelético .....	13
<b>Figura 6.</b>	Espécime adulto da leguminosa alcaçuz com flores .....	16
<b>Figura 7.</b>	Raízes de alcaçuz desidratadas .....	16
<b>Figura 8.</b>	Fórmula molecular do Glicirrinato Dipotássio .....	18
<b>Figura 9.</b>	Esquema representativo do processo de preparação do Glicirrinato Dipotássio .....	18
<b>Figura 10.</b>	Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve ( <b>A, C</b> ) e tratados com DPG ( <b>B, D</b> ). Notar o padrão inalterado das fibras musculares estriadas esqueléticas com núcleo periférico e formato hexagonal, evidenciando a ausência de mionecrose. Aumento: 40x. ....	27
<b>Figura 11.</b>	Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos durante a fase degenerativa (3 e 24 horas) tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D</b> ). Em todas as imagens é possível observar mionecrose, com a presença de células edemaciadas ( <b>e</b> ) e hipercontraídas ( <b>h</b> ), lesão em delta ( <b>d</b> ), <i>ghost fibers</i> ( <b>g</b> ), além de intenso infiltrado inflamatório ( <b>seta</b> ). Aumento: 40x .....	29
<b>Figura 12.</b>	Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve ( <b>A, C, E</b> ) e tratados com DPG ( <b>B, D, F</b> ) após 3, 7 e 21 dias. Observar a ausência de lesão em todos os grupos. Notar a presença de células satélites (mioblastos (**)) e fibras regeneradas ( <b>fr</b> ) nos grupos DPG 7 dias e 21 dias, respectivamente. Aumento: 40x .....	30
<b>Figura 13.</b>	Imunohistoquímica para marcação de IFN- $\gamma$ . Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D</b> ), após 3 e 24 horas. A marcação é mais intensa nas fibras musculares estriadas esqueléticas (*), para o grupo veneno, após 3 e 24 horas ( <b>A, C</b> ) e no tecido conjuntivo, entre as fibras, após 24 horas, para ambos os grupos ( <b>seta</b> ). Aumento 40X .....	32

<b>Figura 14.</b>	Imunohistoquímica para marcação de IFN- $\gamma$ . Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D</b> ), após 7 e 21 dias. A marcação é mais intensa, após 7 dias, entre as fibras musculares estriadas esqueléticas ( <b>seta</b> ). Aumento 40X .....	33
<b>Figura 15.</b>	Imunohistoquímica para marcação de IFN- $\gamma$ . Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve ( <b>A, C, E</b> ) e tratados com DPG ( <b>B, D, F</b> ). A marcação para IFN- $\gamma$ é observada apenas entre as fibras musculares estriadas esqueléticas ( <b>seta</b> ). Aumento 40X .....	34
<b>Figura 16.</b>	Imunohistoquímica para marcação de TNF- $\alpha$ . Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D</b> ), após 3 e 24 horas. A marcação é mais intensa nas fibras musculares estriadas esqueléticas (*), para o grupo veneno após 3 e 24 horas ( <b>A, C</b> ) e no tecido conjuntivo, entre as fibras, após 24 horas, para ambos os grupos ( <b>seta</b> ). Aumento 40X .....	35
<b>Figura 17.</b>	Imunohistoquímica para marcação de myoD. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C, E</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D, F</b> ). Em todas as imagens é possível observar a marcação de myoD nos mioblastos durante o processo de regeneração muscular. Notar a presença de miotubos (***) e fibras regeneradas ( <b>fr</b> ). A marcação é qualitativamente mais intensa após 3 dias, para o grupo DPG e ausente, após 21 dias, para ambos os grupos. É possível observar a presença de miotubos ainda após 21 dias, no grupo VDPG. <b>D, F</b> - Aumento: 40X; <b>E, F</b> - Aumento: 20X .....	38
<b>Figura 18.</b>	Imunohistoquímica para marcação de myoD. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve ( <b>A, C, E</b> ) e tratados com DPG ( <b>B, D, F</b> ). Notar a presença de mioblastos (*) no grupo DPG 7 dias Aumento: 40X.....	39
<b>Figura 19.</b>	Imunohistoquímica para marcação de miogenina. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de <i>B. jararacussu</i> ( <b>A, C, E</b> ), e posteriormente tratados com 2% de DPG ( <b>B, D, F</b> ). Observar a marcação de miogenina (***) durante o processo de regeneração muscular. Aumento: 40X .....	40
<b>Figura 20.</b>	Imunohistoquímica para marcação de miogenina. Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos 7 dias naïve ( <b>A, C, E</b> ) e após terem sido tratados com 2% de DPG ( <b>B, D, F</b> ). Há marcação positiva para miogenina apenas na região de <i>spindle cells</i> (*), para o grupo DPG. Fraca marcação para 21 dias ( <b>E, F</b> ). Aumento: 40X .....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Quantificação das alterações morfológicas observadas nas fibras musculares do músculo gastrocnêmio de camundongos sob a ação de veneno botrópico e a ação conjunta do DPG durante a fase inflamatória .....	26
<b>Tabela 2.</b>	Quantificação das células satélites, mioblastos e miotubos observados no músculo gastrocnêmio de camundongos sob a ação de veneno botrópico e a ação conjunta do DPG durante a fase regenerativa .....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. As serpentes brasileiras .....	3
2.2. Envenenamento Ofídico .....	3
2.2.1. Abordagem Epidemiológica .....	3
2.2.2. O veneno ofídico e suas ações .....	4
2.3. <i>Bothrops jararacussu</i> .....	8
2.4. Tecido muscular esquelético .....	9
2.4.1. Miogênese .....	10
2.4.2. Regeneração Muscular .....	10
2.4.2.1. Citocinas .....	14
2.5. Glicirrizinato Dipotássio (DPG) .....	15
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	21
4.1. Objetivo geral .....	21
4.2. Objetivos específicos .....	21
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
5.1. Animais .....	22
5.2. Veneno .....	22
5.3. Experimentação <i>in vivo</i> .....	22
5.4. Criomicrotomia.....	23
5.5. Imunohistoquímica .....	23
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados epidemiológicos, calcula-se que ocorram, no mundo, mais de 1.840.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com cerca de 94.000 mortes, especialmente nas áreas da África Subsaariana e no sul da Ásia, onde a obtenção e distribuição de soros antiofídicos são difíceis e a estrutura de distribuição é bastante precária (KASTURIRANTE *et al.*, 2008).

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), vinculado ao Ministério da Saúde (MS), registrou em 2013 aproximadamente 159 mil acidentes por animais peçonhentos (serpentes, aranhas e escorpiões) no Brasil, sendo que cerca de 27 mil são atribuídos aos acidentes ofídicos, estes, descritos como “envenenamento causado pela inoculação de toxinas através das presas de serpentes (aparelho inoculador), podendo determinar alterações locais (na região da picada) e sistêmicas” (BRASIL, 2009). Tais acidentes representam sério problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais, dada a sua considerável frequência e morbimortalidade (MORENO *et al.*, 2005).

Os Viperídeos (*Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus* e *Lachesis*) são responsáveis pela maioria destes casos de envenenamento por serpente (BRASIL, 2001) sendo 72% (~20.200) dos acidentes atribuídos ao gênero *Bothrops*.

O gênero *Bothrops* apresenta 32 espécies e subespécies que estão distribuídas nas Américas, desde o México até a Argentina (HOGE; ROMANO, 1972; 1978), compreendendo as serpentes conhecidas popularmente como "jararaca", "jararacuçu", "urutu-cruzeiro", "cotiara", "jararaca-do-rabo-branco", "malha-de-sapo", "patrona", "surucucurana", "combóia", "caiçara" (MELGAREJO, 2003).

O envenenamento botrópico leva a alterações patológicas no local da picada que progridem de modo rápido, frequentemente resultando em sequelas permanentes com efeitos miotóxicos e neurotóxicos (BRASIL, 2001). O único tratamento para este tipo de agravo é o soro antiofídico. Entretanto, apesar do sucesso na neutralização do efeito tóxico sistêmico do veneno, o soro não evita o processo inflamatório desencadeado pela injúria tecidual local (NISHIJIMA, 2010).

A elevada incidência destes acidentes, associada à ineficácia do soro antiofídico

em reverter os danos teciduais locais, torna necessária a busca por terapias alternativas na patogênese da mionecrose e na regeneração muscular após envenenamento botrópico.

Usualmente, e previamente à soroterapia antibotrópica, glicocorticóides são administrados em profilaxia à cascata inflamatória ocasionada pelo veneno (PINHO; PEREIRA, 2001).

O Glicirrizinato Dipotássio (DPG), um sub-produto do Ácido Glicirrízico (AG) extraído das raízes da leguminosa Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), modula processos inflamatórios inibindo a formação do fator de transcrição nuclear  $\kappa B$ , proteína responsável pela transcrição gênica de uma série de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) que participa de cascatas regulatórias dos processos de resposta imune inata e adquirida observadas após a lesão tecidual e também em envenenamentos ofídicos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; KHAN *et al.*, 2013; FELLIPPE, 2013).

Durante o processo de mionecrose eventos moleculares, como a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, são observados e, conseqüentemente estimulam as alterações celulares. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  e o Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) atuam paralelamente nas fases da degeneração e regeneração muscular, sendo este processo concluído após 21 dias (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Na fase de regeneração tecidual, as células satélites ativadas rapidamente passam a expressar a proteína myo D. Os mioblastos gerados irão se diferenciar e formar novas fibras multinucleadas ou fundir com fragmentos finais de fibras já existentes. A proteína miogenina é crucial para esse processo de diferenciação celular e sua ação em ativar a expressão de genes do músculo estriado esquelético ocorre logo após a atividade transcricional de Myo D (GUTIERREZ; OWNBY, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Considerando os potenciais efeitos do DPG sobre diversos tecidos, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a ação protetora do DPG sobre a histoarquitetura do músculo gastrocnêmio, e sua possível contribuição na expressão proteica de myo D, miogenina, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , após envenenamento botrópico experimental.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. As serpentes Brasileiras**

O Brasil, por seu clima tropical e grande diversidade natural, apresenta uma das mais ricas faunas de serpentes (BERNARDE, 2011), composta por 11 famílias e cerca de 380 espécies (BÉRNILS; COSTA, 2012).

Dentre todas as espécies conhecidas, existem aquelas que possuem importância médica, base para os estudos toxicológicos, e também para a produção de antiveneno para tratamento das vítimas de acidentes ofídicos. As famílias Elapidae e Viperidae reúnem as espécies peçonhentas e compreende cerca de 60 espécies, no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2003; PINHO; PEREIRA, 2001).

Dentre os gêneros encontrados no Brasil, destacam-se: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* (Viperidae) e *Micrurus* (Elapidae) (BÉRNILS; COSTA, 2012).

### **2.2. Envenenamento Ofídico**

#### **2.2.1. Abordagem epidemiológica**

O envenenamento ofídico é considerado um grave problema de saúde pública, especialmente na América Latina, África e Ásia, dado ao grande número de acidentes causados por serpentes. Embora haja controvérsias em relação à metodologia empregada, anualmente em todo o mundo, ocorrem cerca de 3 a 5,4 milhões de acidentes resultando em cerca de 2,5 milhões de envenenamentos e 125 a 150 mil mortes em humanos (CHIPPAUX, 1998). Segundo Kasturirante *et al.* (2008) estes números são menores, sendo 1,2 a 5,5 milhões de acidentes, 421.000 casos de envenenamentos e 20.000 mortes.

Com cerca de 20.000 casos por ano, o Brasil é o país com o maior número de acidentes da América do Sul, seguido por Peru, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (CHIPPAUX, 1998; WARREL, 2004). O perfil epidemiológico, baseado nos casos registrados entre 1901 e 2000, revelou que os acidentes ofídicos ocorrem com

maior frequência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, principalmente em trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos e acometem, sobretudo, membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

O SINAN registrou 27.135 casos de acidentes ofídicos em 2013, sendo que as serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* responderam por 73% dos casos notificados neste período.

A região Nordeste apresenta o menor coeficiente de incidência de acidentes ofídicos do País (6,84/100.000 habitantes), porém registra a maior letalidade (0,81%), cerca do dobro da média nacional (0,45%), provavelmente como consequência de subnotificações e das dificuldades de acesso aos serviços de saúde (CHIPPAUX, 1998; WARREL, 2004).

Os casos de morte por envenenamento botrópico são raros, ocorrendo em 0,3-0,5% dos casos, geralmente poucos dias após a picada (RIBEIRO; JORGE, 1997) e apresentam como principais causas de morte: a insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda, a hemorragia, o choque e a sepse (AMARAL *et al.*, 1986; RIBEIRO *et al.*, 1998).

### **2.2.2. O veneno ofídico e suas ações**

Os venenos ofídicos são compostos por moléculas de natureza química diversa como proteínas, nucleotídeos, íons inorgânicos (cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco), carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídios) e aminas biogênicas (tipo histamina). A maior parte das toxinas presentes no veneno de serpente é formada por proteínas e peptídeos (90 - 95%) (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Entre as proteínas estão as proteases (metaloproteases e serinoproteases), as fosfolipases  $A_2$ , fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-amino oxidases, catalases, ATPases, hialuronidasas, NAD nucleosidasas, e  $\beta$ -glicosaminidasas (MATSUI *et al.*, 2000).

Além destes, os venenos das serpentes possuem outros componentes proteicos não enzimáticos com uma variedade de efeitos biológicos, como as desintegrinas (SAJEVIC *et al.*, 2011), peptídeos biologicamente ativos com atividades neurotóxicas

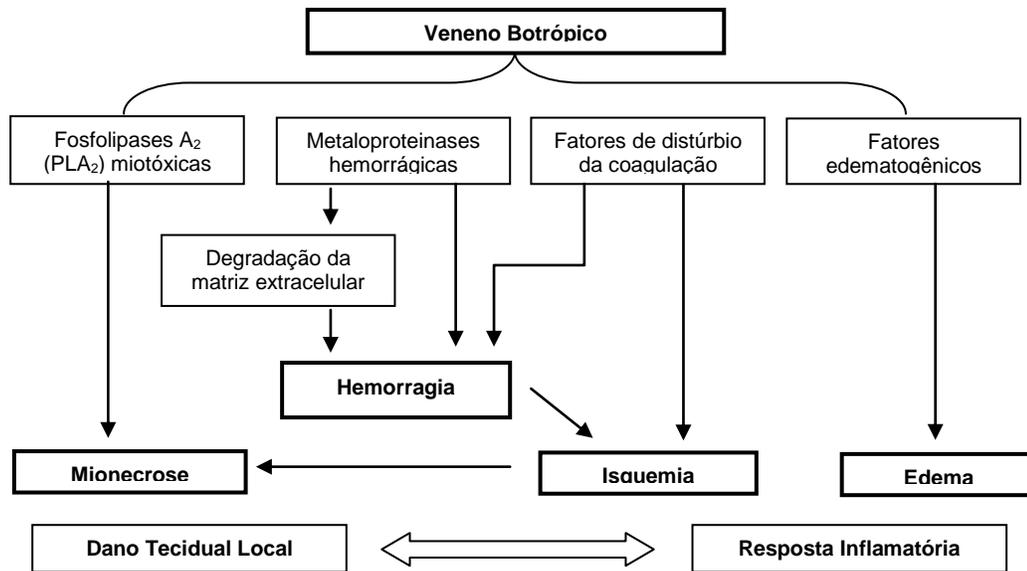
(PATIÑO *et al.*, 2013) e cardiotoxica (TSETLIN; HUCHO, 2004), e lectinas do tipo C (BRINKHOUS *et al.*, 1983).

O veneno botrópico possui três atividades principais: proteolítica, coagulante e hemorrágica.

- **Ação Proteolítica** (BRASIL, 2001): de importância fundamental para a caracterização clínica do acidente e de patogênese complexa, esta ação determina edema inflamatório na região da picada;
- **Ação Coagulante** (BRASIL, 2001): atua através de uma ou mais ações como trombina símile (semelhante à ação da trombina), ativadora de protrombina e do fator X, promovendo consumo dos fatores de coagulação com consequente alteração da coagulação sanguínea. Pode ocorrer trombocitopenia nas primeiras horas após o acidente;
- **Ação Hemorrágica** (BRASIL, 2001): atua no endotélio vascular na região da picada e, provavelmente, também à distância e é decorrente da ação das hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares, levando à hemorragias em diversos locais.

Outras atividades que podem participar da fisiopatologia do envenenamento são a neurotóxica e agregadora de plaquetas (RIBEIRO; JORGE, 1997).

As alterações patológicas no local da picada, anteriormente descritas, progredem de modo rápido e, frequentemente, resultam em sequelas permanentes com efeitos miotóxicos (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991; PELLEGRINI FILHO; BRAZIL, 1976). Tal fisiopatologia é atribuída às atividades químicas e biológicas de fatores hemorrágicos, enzimas promotoras de distúrbios da coagulação (fibrinogenolíticas, fibrinolíticas), enzimas proteolíticas e miotoxinas presentes nos venenos (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema representativo dos possíveis efeitos locais induzidos pelos venenos botrópicos. Adaptado de Gutiérrez e Lomonte (2003).

A miotoxicidade é causada pelas miotoxinas encontradas no veneno das serpentes, que atua direta e especificamente sobre o músculo estriado esquelético, podendo levar à sua degeneração e morte celular (mionecrose) (CARREIRO; COGO; PRIANTI Jr., 2009). Esta atividade apresenta dois padrões clínicos diferentes: miotoxicidade sistêmica, sendo caracterizada por dano muscular difundido, incrementos pronunciados na atividade creatina quinase plasmática e mioglobinúria, frequentemente associada com alterações renais e hipercalemia; miotoxicidade local, caracterizada por mionecrose na região anatômica onde o veneno é injetado. Esta mionecrose local é muitas vezes relacionada a outros efeitos, tais como hemorragia e edema em um complexo padrão de dano do tecido local (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003) (**Figura 2**).

A miotoxicidade local ocorre por dois mecanismos fundamentais: ação direta das miotoxinas sobre as células musculares originando lesão ou isquemia que se desencadeia no tecido como consequência do sangramento, compressão tissular e outras alterações inflamatórias (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; LOMONTE *et al.*, 2003; PONCE-SOTO *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Lesões locais ocasionadas por acidentes botrópicos. **Fonte:** Cobras Brasileiras. Disponível em: <[www.cobrasbrasil.com.br](http://www.cobrasbrasil.com.br)>. Acessado em 09/07/2014.

Os componentes miotóxicos são conhecidos como miotoxinas de aproximadamente 14 kDa, cujas propriedades estruturais permitem classificá-las como PLA<sub>2</sub> (CINTRA *et al.*, 1993; MANCUSO *et al.*, 1995). Algumas apresentam atividade enzimática (PLA<sub>2</sub> D49), enquanto outras, apesar de apresentarem estrutura molecular de fosfolipase, não apresentam atividade (PLA<sub>2</sub> homóloga K49), porém ambas induzem miotoxicidade em células musculares estriadas esqueléticas (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995).

A administração exógena de PLA<sub>2</sub> em animais experimentais desencadeia uma cascata de eventos inflamatórios, caracterizada pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, recrutamento de leucócitos em tecidos, nocicepção e liberação de mediadores inflamatórios, os quais desencadeiam um número de desordens inflamatórias sistêmicas e locais também em humanos (TEIXEIRA *et al.*,

2003).

Também são responsáveis pelos efeitos inflamatórios e edematogênicos observados nos casos clínicos e nos modelos experimentais. Outras frações do veneno botrópico, como aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

### **2.3. *Bothrops jararacussu***

A *Bothrops jararacussu*, popularmente conhecida como jararacuçu, é uma serpente muito comum no Brasil; habita preferencialmente ambientes úmidos, como matas, margens de rios e lagos, áreas cultivadas e locais onde há facilidade para proliferação de roedores, como celeiros e depósitos de lenha, zonas rurais e periferia das grandes cidades (BRASIL, 2009) e têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Pode apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos (BRASIL, 2001), destacando-se como causadora de 93,57% dos acidentes botrópicos com identificação do animal (CARDOSO; BRANDO, 1982).

Um espécime adulto de *B. jararacussu* pode alcançar 2,2m de comprimento e injetar até 4 mL de veneno, correspondendo a 1g de veneno em peso seco (MELGAREJO, 2003). Encontrada no Brasil, Paraguai, sul da Bolívia e nordeste da Argentina (MARTINS, 2010), é uma das mais estudadas espécies do gênero *Bothrops*.

Seu veneno apresenta ação hemorrágica causada por metaloproteases, que provocam lesões na membrana dos capilares, e também apresentam ação coagulante, transformando diretamente o fibrinogênio em fibrina, além da ação proteolítica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; VORONOV *et al.*, 1999) caracterizadas por dor imediata de intensidade variável (JIMÉNEZ-PORRAS, 1973) (**Figura 3**).

Bothrops  
jararacussu



**Figura 3.** Espécime adulto de *Bothrops jararacussu* **Fonte:** Cobras Brasileiras. Disponível em: <[www.cobrasbrasil.org.br](http://www.cobrasbrasil.org.br)>. Acessado em 09/07/2014.

O tratamento mais eficaz para o envenenamento botrópico é a terapia com soro antibotrópico (antiveneno), sendo que a dose de antiveneno administrada é determinada de acordo com a sintomatologia do envenenamento, classificada de acordo com o Ministério da Saúde em leve, moderada ou grave. Entretanto, o antiveneno não é capaz de reverter o quadro de necrose (ZYCHAR, 2007), embora experimentalmente possa prevenir seu desenvolvimento se administrado precocemente (BARBOSA *et al.*, 2008).

No caso de *B. jararacussu*, embora a soroterapia seja feita principalmente com o antiveneno botrópico, há evidências clínicas (BRAZIL, 1909) e experimentais (DOS SANTOS *et al.*, 1992) de que a letalidade pode ser melhor neutralizada por uma mistura de antivenenos botrópico e crotálico. Queiroz *et al.* (2008) atribuíram a baixa neutralização do veneno de *B. jararacussu* por antiveneno botrópico às diferenças imunológicas entre as proteinases do veneno e os anticorpos presentes no antiveneno botrópico.

#### **2.4. Tecido muscular esquelético**

Responsável pelos movimentos corporais e de origem mesodérmica, o tecido muscular estriado esquelético é formado por numerosas fibras, constituídas de feixes de células cilíndricas muito longas e multinucleadas que apresentam estriações

transversais. Estas fibras estão envoltas por camadas gradualmente mais complexas de tecido conjuntivo. Sua contração é rápida, vigorosa e sujeita ao controle voluntário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; GUYTON; HALL, 1996). Este tipo de músculo compõe 40% do corpo humano (GUYTON; HALL, 1996).

A contratilidade muscular é fornecida por proteínas especializadas do citoesqueleto, ativadas por um complexo sistema de sinalização molecular disparado por potenciais de ação que percorrem a sua membrana plasmática (LENT, 2001).

#### **2.4.1. Miogênese**

O processo de formação das células musculares, a miogênese embrionária, ocorre a partir das células mesenquimais. Através dos mecanismos sinalizadores, a célula mesenquimal perde seus prolongamentos tornando-se arredondada – o pré-mioblasto. Os pré-mioblastos ou mioblastos imaturos apresentam atividade mitótica e não expressam nenhuma proteína muscular. Os pré-mioblastos tornam-se fusiformes e, quando começam a expressar a desmina, são denominados mioblastos. Conforme o desenvolvimento muscular prossegue, vários mioblastos se unem, perdem seus limites celulares e, como resultado, tem-se uma célula longa com vários núcleos, o miotubo. O miotubo continua seu desenvolvimento; as miofibrilas se organizam no interior da célula e os núcleos passam a ter localização periférica. Dessa forma, origina-se a célula muscular estriada esquelética ou miofibrila (GITIRAMA, 2007).

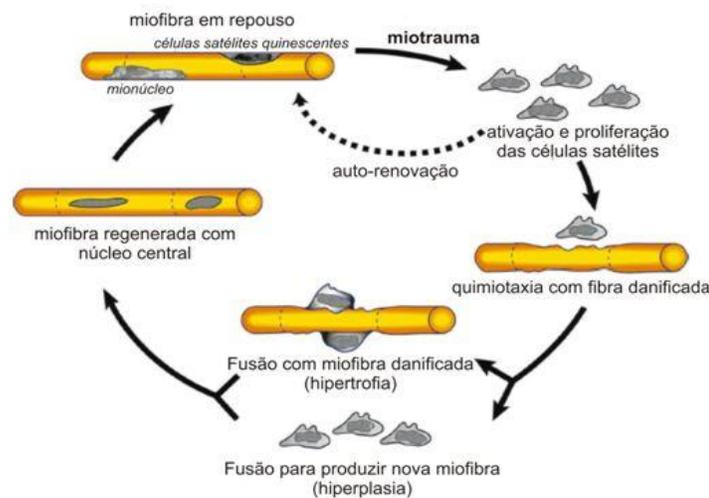
#### **2.4.2. Regeneração Muscular**

As mionecroses, caracterizadas por danos nas fibras musculares (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985), são bastante comuns em envenenamentos botrópicos (GUTIERREZ; LOMONTE, 2003) e independentemente de sua origem, a patogênese da mionecrose tende a seguir um padrão (ROCHA, 2008).

Quando sofre algum tipo de injúria, estruturalmente, a célula muscular tem seu sarcolema lisado, ocorrendo a permeabilização de componentes extracelulares para o meio intracelular, e componentes intracelulares para o meio extracelular,

consequentemente há um desequilíbrio iônico, aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , distúrbios osmóticos e edema celular, tal evento promove a formação de lesões delta, hipercontração das miofibrilas, seguida pela perda de registro dos sarcômeros, aglutinação compacta dos miofilamentos e o desarranjo do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias (ROCHA, 2008). Uma vez que não possui capacidade mitótica, se regenera a partir da ativação e diferenciação das células satélites em mioblastos (MOZZETTA *et al.*, 2011) (**Figura 4**).

As células satélites são células progenitoras mononucleares encontradas no músculo maduro entre a lâmina basal e o sarcolema. Normalmente se apresentam quiescentes, sendo ativadas em respostas aos estímulos, que neste caso, é a injúria muscular (HUARD *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Esquema representativo da regeneração do tecido muscular estriado esquelético a partir da ativação e diferenciação das células satélites (www.efdeportes.com). Acesso em 25/06/2014.

A regeneração muscular ocorre a partir da habilidade do sistema musculoesquelético em determinar mudanças estruturais e funcionais a fim de que o tecido se adapte a estímulos que desequilibrem sua homeostasia, demonstrando, portanto, sua plasticidade (BALDWIN; HADDAD, 2002).

Mediada por interações intercelulares com a matriz extracelular (MEC) e composta por uma série de eventos inter-relacionados, a regeneração muscular caracteriza-se por três fases: inflamatória, reparação e remodelagem (JARVINEN *et al.*, 2005).

Neste contexto, quando o músculo sofre algum dano, inicialmente, ocorre a fase inflamatória (0-7 dias) caracterizada pela ruptura e posterior necrose das fibras musculares, com formação de hematoma, edema e exudato de fibrina (CHARGE; RUDNICKI, 2004). Nesta fase, os neutrófilos invadem rapidamente o local da lesão e promovem a inflamação pela liberação de citocinas que podem atrair e ativar células inflamatórias adicionais (LIMA *et al.*, 2007). A própria injúria muscular induz a liberação no espaço extracelular de mediadores da resposta inflamatória e outras moléculas biologicamente ativas (RUBIN FABER, 1988). Em seguida, o número de macrófagos aumenta e ocorre a invasão da fibra muscular lesada.

Na 2ª fase (7-21 dias), há a fagocitose do tecido necrosado, coagulação de fibrina, síntese de fibronectina, colágeno e outros componentes da matriz extracelular; crescimento sinovial e capilar, com aumento de uma segunda subpopulação de macrófagos que está associada à regeneração muscular, e proliferação das células miogênicas (MESCHER; NEFF, 2005).

Já na fase de maturação e remodelamento (21 dias ou mais) há maturação das miofibras, diminuição gradual do volume de capilares, início da organização das fibras de colágeno tipo I e finalmente restauração da capacidade funcional do músculo reparado (TIDBALL, 1995; JARVINEN, 2000; KANNUS, 2003; ROCHA, 2007; 2008; 2010).

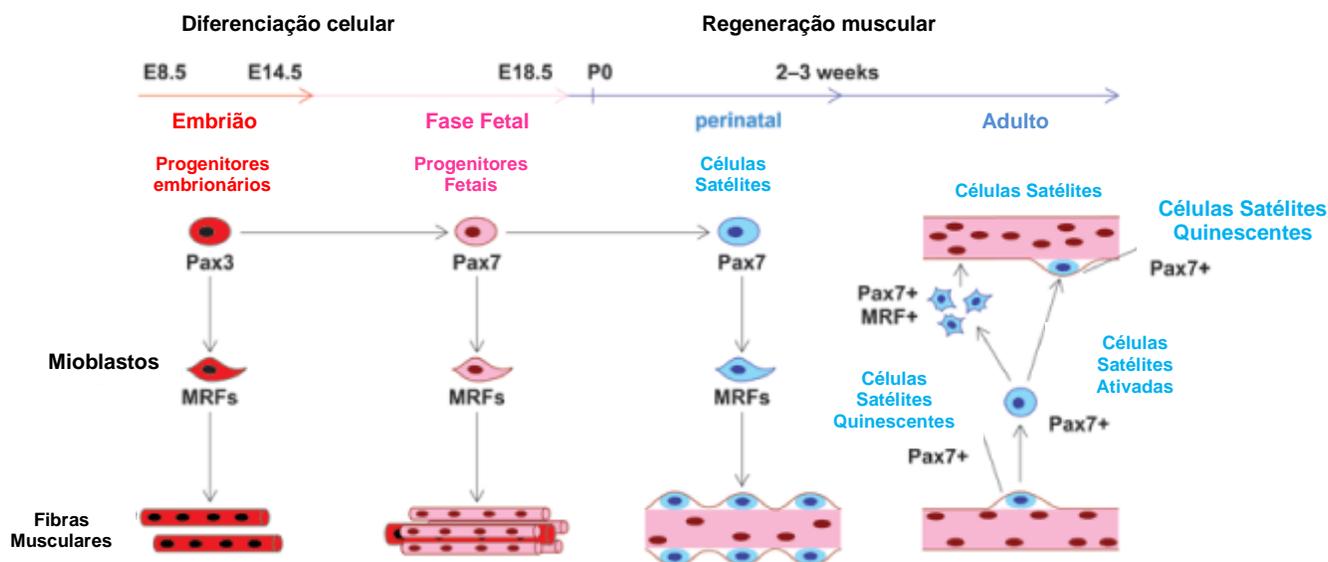
Alguns genes específicos do músculo estriado esquelético atuam durante este processo de regeneração, são denominados como fatores regulatórios miogênicos (MRF), e pertencem à superfamília de fatores de transcrição, “basic helix-loop-helix” (bHLH) (CHARGE; RUDNICK, 2004).

A família MRF consiste de Myo D, Myf-3, Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF-4 (Myf-6/Herculin). Myo D e o Myf-5 são os fatores primários e agem na determinação miogênica, a expressão de Myo D é induzida em 12 horas, enquanto a Miogenina e o MRF-4, fatores de diferenciação, têm expressão tardia, durante a fusão e diferenciação celular (SABOURIN *et al.*, 2000) (**Figura 5**).

No músculo inalterado, células satélites, como já mencionadas, são normalmente quiescentes e expressam marcadores como Pax-7, CD34 e M-caderina (ZAMMIT *et al.*, 2006), entretanto, ao recuperar sua atividade mitótica e reingressar no ciclo celular, as células satélites ativadas rapidamente iniciam a expressão de Myo D. Os mioblastos

gerados irão se diferenciar e, então, fundir para formar novas miofibras multinucleadas (FUCHTBAUER; WESTPHAL, 1992; GROUNDS *et al.*, 1992; 1993; YABLONKA-REUVENI; RIVERA, 1994; YABLONKA-REUVENI *et al.*, 1999; ZAMMIT *et al.*, 2004, SHI; GARRY, 2006). Nesta fase há expressão da miogenina, com um concomitante declínio na expressão de Pax7 e Myf-5, saída do ciclo celular (YABLONKA-REUVENI; RIVERA, 1994; YABLONKA-REUVENI *et al.*, 1999; YABLONKA-REUVENI; PATERSON, 2001; HALEVY *et al.*, 2004; SHEFER *et al.*, 2006; ZAMMIT *et al.*, 2006).

A miogenina é crucial para o processo de diferenciação das células miogênicas *in vivo* e sua ação em ativar a expressão de genes do músculo esquelético ocorre logo após a atividade transcricional de Myf-5 e Myo D (HASTY *et al.*, 1993; NABESHIMA *et al.*, 1993).



**Figura 5.** Esquema representando a diferenciação celular e expressão gênica no músculo estriado esquelético (<http://accessscience.com/overflow.aspx?SearchInputText=Muscle+development+and+regeneration&ContentTypeSelect=10&term=Muscle+development+and+regeneration&rootID=802265>). Acessado em 17/05/2013.

Portanto, embora haja mionecrose, o músculo estriado esquelético apresenta uma resposta regenerativa que restaura a citoarquitetura dentro de um curto período (HAWKE; GARRY, 2001; COSSU; BIRESSI, 2005; DHAWAN; RANDO, 2005; HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005), onde o microambiente em que a miogênese ocorre varia entre a miogênese embrionária e a miogênese regenerativa (TIDBALL, 2005).

Estudos *in vitro* têm evidenciado vários fatores tróficos, como os membros da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), de crescimento do tipo insulina (IGFs), de crescimento de hepatócitos (HGF), neurotrofinas e citocinas, entre elas o fator de transformação de crescimento e interleucina- 6 (IL-6) (HAWKE; GARRY, 2001).

Vários mediadores participam da resposta inflamatória: 1) quimiocinas, que realizam quimiotaxia de leucócitos; 2) enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, que aumentam a permeabilidade vascular; 3) plasmina que degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilotoxinas que induzem degranulação de mastócitos e conseqüentemente liberação da histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microorganismos, facilitando a fagocitose; 4) mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, que participam do aumento da permeabilidade vascular; 5) citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), que induzem efeitos locais, tais como expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos e efeitos sistêmicos, como expressão de proteínas da fase aguda levando a febre (BILATE, 2007).

#### **2.4.2.1. Citocinas**

As citocinas, grupo heterogêneo de proteínas reguladoras, de baixo peso molecular, como o TNF- $\alpha$  e algumas interleucinas, têm papel importante como mediadoras nos processos inflamatórios e imunológicos, na proteólise, no recrutamento celular e no reparo tecidual (FUKUDA, 2011).

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), produzido a partir de macrófagos e mastócitos, quando presentes em elevados níveis, ou por liberação a partir de células inflamatórias ou pelas próprias fibras degeneradas (TEWS; GOEBEL, 1997), bem como em algumas miopatias (KURU *et al.*, 2003), ou até mesmo por ação de cardiotoxinas (CHEN *et al.*, 2005) corroborando para a regeneração.

O TNF- $\alpha$  é responsável por iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-6 e IL-1, por exemplo), bem como aumentar da permeabilidade vascular, ativar monócitos e neutrófilos e destruir diretamente células infectadas ou malignas (McDERMOTT, 2001). Seu papel na regeneração muscular varia de acordo com o tipo, a gravidade, localização

e estágio da injúria (TIDBALL, 2005). Além de inibir a síntese de colágeno e fibronectina pelos fibroblastos e diminuir a proliferação das células endoteliais (SHÄFFER; BARBUL, 1998), também aumenta a proliferação e a agregação de mioblastos (PASCHALIS *et al.*, 2005).

Em contrapartida, esta citocina inibe expressão dos fatores de transcrição MyoD, e Miogenina, os quais regulam a atividade de genes específicos como genes de proteínas de miofilamentos, e bloqueia a síntese de RNAs mensageiros de marcadores de diferenciação miogênicos como  $\alpha$ -actina (SZALAY *et al.*, 1997). Sua ativação prolongada tem sido associada à perda das fibras musculares (SHARMA; ANKER, 2002) e ao retardo no processo de regeneração (MORESI *et al.*, 2008).

Outra citocina importante em diferentes respostas imunológicas e inflamatórias é o IFN- $\gamma$ , que atua principalmente em estágios agudos da inflamação (NAOUM, 2001).

O IFN- $\gamma$  influencia diretamente a homeostase e o reparo do músculo esquelético, inibindo a fibrose (FOSTER *et al.*, 2003). Em cultura de células musculares o IFN- $\gamma$  aumenta a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), moléculas de adesão intracelular (ICAM-1), proteínas quimiotáteis de monócitos (MANTEGAZZA *et al.*, 1991; REYES-REYNA; KROLICK, 2000), além da ativação de macrófagos e da proliferação e diferenciação de mioblastos (TOMITA; HASEGAWA, 1984; KELIC *et al.*, 1993). Endogenamente, a produção de IFN- $\gamma$  é requerida para uma eficiente regeneração muscular por seu efeito direto nas fibras (CHENG *et al.*, 2008).

Sabe-se que a elevada expressão de citocinas, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , nas fases I (após 3h) e II (após 3 dias) também contribui para a diferenciação das células precursoras musculares (ROCHA, 2010).

## **2.5. Glicirrizinato Dipotássio (DPG)**

O alcaçuz – *Glycyrrhiza glabra* (**Figura 6**), especificamente sua raiz, vem sendo estudado, desde os tempos mais remotos, na medicina tradicional devido ao seu valor nutritivo e à suas propriedades medicinais (SALEEM *et al.*, 2011). Na medicina tradicional chinesa, o alcaçuz tem ação farmacológica e fisiológica, como a desintoxicação, indução da diminuição da glicose, ação anti-tumoral,

hipocolesterolêmica, anti-histamínica, anti-leucêmica, antibiótica e anti-inflamatória (SHIBATA, 2000). Saleem *et al.* (2011) também relatam a ação dos extratos de raízes como radioprotetores.



**Figura 6.** Espécime adulto da leguminosa alcaçuz com flores. (<http://portalvegetal.com/wp-content/uploads/2013/03/alcacuz2.jpg>). Acessado em 24/06/2014.

Análise fitoquímica do extrato de raiz do alcaçuz (**Figura 7**) evidenciou a presença de diversos componentes como: saponinas, triterpenos, flavonoides, cumarinas, açúcares simples e polissacarídeos (SALEEM *et al.*, 2011).



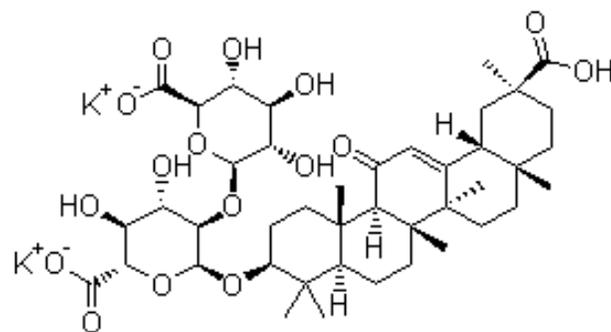
**Figura 7.** Raízes de alcaçuz desidratadas. (<http://www.readersdigest.co.nz/licorice-root-health-and-medical-benefits>). Acessado em 24/06/2014.

O Ácido Glicirrízico (AG -  $C_{42}H_{62}O_{16}$ ) é um composto natural isolado do alcaçuz que apresenta importantes propriedades biológicas e farmacológicas como anti-inflamatória, anti-viral e anti-câncer. Estudo recente com modelo de câncer de cólon em ratos *Wistar* mostrou que o AG apresenta potencial quimioprotetor contra lesões causadas por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), como criptas aberrantes, depleção de mucina, hiperproliferação, inflamação e apoptose (KHAN *et al.*, 2013).

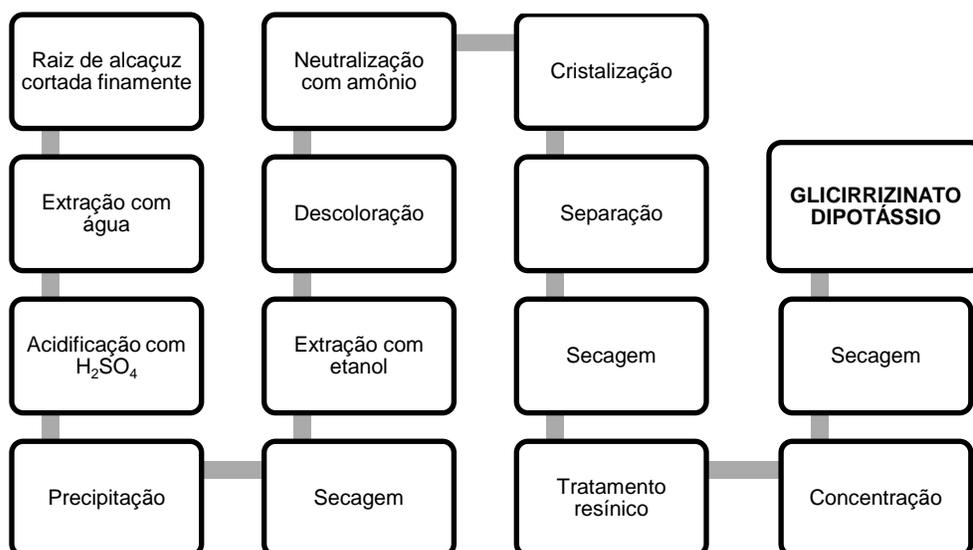
Doses orais de AG (15mg/Kg) reduzem o infiltrado inflamatório por diminuição do número de mastócitos, supressão na imunomarcção de Ki-67, NF- $\kappa$ B-p65, COX<sub>2</sub>, iNOS e VEGF e aumento na imunomarcção de p53, conexina-43, caspase-9 e caspase-3 clivada, além da redução dos níveis de TNF- $\alpha$  (KHAN *et al.*, 2013).

De acordo com Klosa (1957) a DL<sub>50</sub> dos vários componentes do AG administrados em ratos foi determinada em 1,2mg/Kg via oral para o Glicirrinato Monopotássio e 1,4mg/Kg intraperitoneal para o Glicirrinato Dipotássio. Já a administração intravenosa de Glicirrizina (120mg) transformada em AG quando metabolizada por uma bactéria intestinal que contenha  $\beta$ -D-glucuronidase, tem sido usada em países da Europa e da Ásia para o tratamento de doenças do fígado, como a hepatite C crônica. Neste caso a ação anti-inflamatória do AG pode ser mediada pela ligação direta da molécula à membrana celular, especialmente a lipocortina (van ROSSUM *et al.*, 1998). Outros estudos afirmam que a ação anti-inflamatória é mediada por interação com a bicamada lipídica (SCHROFELBAUER *et al.*, 2009). AG de forma intravenosa (20mg/Kg) também tem sido utilizado em casos experimentais de hepatectomia, apresentando ação anti-inflamatória e anti-oxidante, reduzindo os níveis séricos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e inibindo a liberação de citocromo C (TANG *et al.*, 2007).

O Glicirrinato Dipotássio (DPG -  $C_{42}H_{60}K_2O_{16}$ ) (**Figura 8**) é um subproduto do AG extraído em água, da raiz de alcaçuz, que quando seco por evaporação resulta em um pó branco, inodoro e de paladar adocicado (**Figura 9**).



**Figura 8.** Fórmula molecular do Glicirrizinato Dipotássio. (<http://www.guidechem.com/reference/dic-26513.html>). Acessado em 23 mar. 2013.



**Figura 9.** Esquema representativo do processo de preparação do Glicirrizinato Dipotássio. Adaptado de: Maruzen Pharmaceuticals Co., LTD. (2008).

Esta substância tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica e cosmética, uma vez que pode ser utilizada com frequência ou continuamente sem apresentar efeitos colaterais, devido às suas ações antitumoral, anti-histamínica, antibiótica e anti-inflamatória (SHIN *et al.*, 2012).

O DPG assemelha-se aos corticóides quanto às suas propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas, porém sem apresentar os mesmos efeitos colaterais tais como eritema, hipersudorese ou reações alérgicas na pele (CEC EDITORE, 2013).

A eficácia anti-inflamatória do DPG ao nível celular é devido à inibição da enzima hialuronidase envolvida no dano à matriz extracelular e responsável pela liberação de histamina a partir de grânulos de mastócitos. Além disso, o DPG inibe a liberação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos), apresentando um efeito antialérgico único (CEC EDITORE, 2013).

Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar a ação do DPG sobre a musculatura estriada esquelética de camundongo submetidos a envenenamento botrópico experimental.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista o alto número de casos de envenenamento por animais peçonhentos, inclusive no Brasil, e a ineficácia dos soros antiofídicos em neutralizar os danos teciduais locais induzidos pelo veneno de serpentes, e também nas propriedades farmacológicas descritas para o Glicirrizinato Dipotássio, o presente trabalho pretende estudar os efeitos do DPG sobre a musculatura estriada esquelética de camundongos submetidos ao envenenamento botrópico experimental na tentativa de caracterizar os possíveis benefícios do DPG como terapia coadjuvante no tratamento do ofidismo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ação do Glicirrizinato Dipotássio sobre a musculatura estriada esquelética, especificamente o músculo gastrocnêmio de camundongo submetidos a envenenamento botrópico experimental.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a dinâmica do processo de regeneração muscular na fase inflamatória correlacionando com a marcação local das proteínas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , para compreender o processo de mionecrose;
- Avaliar a marcação local das proteínas myo D e miogenina, para qualificar o processo de regeneração muscular;
- Averiguar a ação do Glicirrizinato Dipotássio durante a mionecrose e regeneração muscular.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Animais

Camundongos machos (n = 40), da linhagem Swiss (*Mus musculus*), com oito semanas de idade (25-30 g) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em gaiolas (n = 4) no biotério da Universidade São Francisco (USF/Bragança Paulista) em fotoperíodo de 12 h claro/escuro, temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , com acesso *ad libitum* à comida e água. Todos os procedimentos experimentais com os animais obedeceram às normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL - antigo COBEA) e foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética Animal da Universidade São Francisco (Protocolo nº 001.05.2013).

### 5.2. Veneno

O veneno bruto da *Bothrops jararacussu* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Léa Rodrigues-Simioni. Para os procedimentos o veneno foi diluído em solução NaCl estéril a 0,9% apenas no momento de uso.

### 5.3. Experimentação *in vivo*

A experimentação animal foi realizada tendo em vista a ação individualizada e conjunta do veneno bruto de *B. jararacussu* e do Glicirrizinato Dipotássio (grupos experimentais) e as fases de mionecrose e regeneração (tempos de sobrevivência), a saber:

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: I) animais que receberam injeção intramuscular (i.m.) de solução de veneno bruto de *B. jararacussu* (100 µg/mL; 100 µL) (grupo V); II) animais que receberam, após a injeção i.m. da solução de veneno, injeção i.m. de Glicirrizinato Dipotássio a 2% após uma hora (1,4µg/g do peso do animal; 100µL) (grupo VDPG), III) animais que receberam injeção i.m. da solução de

Glicirrizinato Dipotássio a 2% (1,4µg/g do peso do animal; 100µL) (grupo DPG); animais que não receberam nenhuma injeção i.m. (*naïve* – grupo N).

Para a injeção i.m. do veneno bruto ou da solução de Glicirrizinato Dipotássio, os animais foram contidos manualmente através do dorso com o auxílio de um pano, de modo gentil e seguro, e a área limpa com álcool 70%.

A fase de mionecrose foi averiguada nos tempos de sobrevivência de 3 e 24 horas e a fase de regeneração nos tempos de sobrevivência de 3, 7 e 21 dias.

Assim sendo, 4 animais receberam, em sua pata direita, solução de veneno e, em sua pata esquerda, solução de veneno + Glicirrizinato Dipotássio; e outros 4 animais receberam em sua pata direita solução de Glicirrizinato Dipotássio e nenhuma solução em sua pata esquerda, para cada tempo de sobrevivência, observando-se os cinco intervalos de tempo expressos no parágrafo anterior.

Os animais foram submetidos a eutanásia com doses letais de anestésico 3 e 24 horas, 3, 7 e 21 dias após o tratamento, e os músculos gastrocnêmios foram dissecados e processados para criomicrotomia.

#### **5.4. Criomicrotomia**

Os músculos gastrocnêmios dissecados foram seccionados e o terço médio fixado em papel filtro com auxílio de resina *OCt-Tissue Tek* (Sakura, Japão), em solução de n-hexano resfriada em nitrogênio líquido. Cortes histológicos de 14 µm foram obtidos em criostato *Leica* CM 1850 da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os cortes foram submetidos a técnica de coloração com hematoxilina e eosina.

#### **5.5. Imunohistoquímica**

Para análise da expressão das proteínas myo D e miogenina, TNF-α e IFN-γ, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-Myo D 5.8 (código 32758), anti-miogenina 5FD (código 12732), anti-TNF-α (código 500-P64), anti-IFN-γ (código 500-P119) e o sistema *Santa Cruz Biotechnology* foi utilizado como anticorpo secundário em

todas as reações realizadas. As reações foram reveladas com DAB (1 minuto) e contracoradas com hematoxilina (30 segundos).

Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa *Santa Cruz Biotechnology Inc.* (CA, USA):

- ✓ TNF- $\alpha$  (N-19): sc – 1350 Anti-cabra
- ✓ IFN- $\gamma$  (C-20): sc – 700 Anti-coelho
- ✓ myoD (5.8A): sc – 32758 Anti-rato
- ✓ miogenina (F5D): sc - 12732 Anti-rato

As lâminas histológicas obtidas em criostato foram fixadas em álcool etílico e álcool metílico (100%) resfriados à -20°C, por 10 minutos cada banho. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10% por 30 min, lavados em PBS 0,05M, tratados em solução de PBS/BSA a 1% por 1 h para bloqueio das proteínas inespecíficas, e novamente lavados em PBS 0,05 M. A área próxima aos cortes foi seca, delimitada e sobre estes aplicado 50  $\mu$ L de anticorpo primário (1:50) diluído em PBS/BSA 1% (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co, Mo, USA) a 4°C, em câmara úmida, *overnight*.

Passado o período de incubação no anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS 0,05M e incubadas com anticorpo secundário em temperatura ambiente, seguindo as instruções do fabricante. As reações de imunohistoquímica foram reveladas com 3-3'diaminobenzidina (Dako, Dinamarca, código K3648) e contracoradas com solução de hematoxilina Harris por 30 segundos.

Após os ensaios imunohistoquímicos, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, e as lâminas montadas com Permont para análise em microscópio de luz.

O controle das reações foi obtido pela omissão do anticorpo primário durante a reação.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A patogênese da mionecrose causada pelo envenenamento botrópico é acompanhada por inúmeras alterações sistêmicas e locais. A gravidade da patogênese é devida à complexidade da composição química do veneno, principalmente proteínas enzimáticas, como a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (ROCHA, 2008).

Neste sentido, e levando-se em consideração a ineficiência dos soros antiofídicos em neutralizar os danos teciduais locais induzidos pelo veneno de serpentes, a busca por alternativas terapêuticas que visam minimizar o dano local é de grande valia.

Como já visto por outros autores, o quadro clássico da mionecrose é caracterizado pelo surgimento de lesões em delta, estas progredindo para as regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas, apresentando espaços vazios no sarcoplasma (*ghost fibers*), decorrente do eventual relaxamento dos miofilamentos agrupados, alterações no mecanismo da coagulação, ativação e adesão leucocitária, aumento da permeabilidade e vasodilatação (HOMA e TU, 1971).

Segundo Duncan (1978), a ocorrência de regiões de hipercontração é decorrente do rápido e incontrolado influxo de cálcio, já a condensação de miofibrilas pode ser explicada através do eventual relaxamento das miofibrilas, possivelmente devido à ativação de proteases cálcio-dependentes.

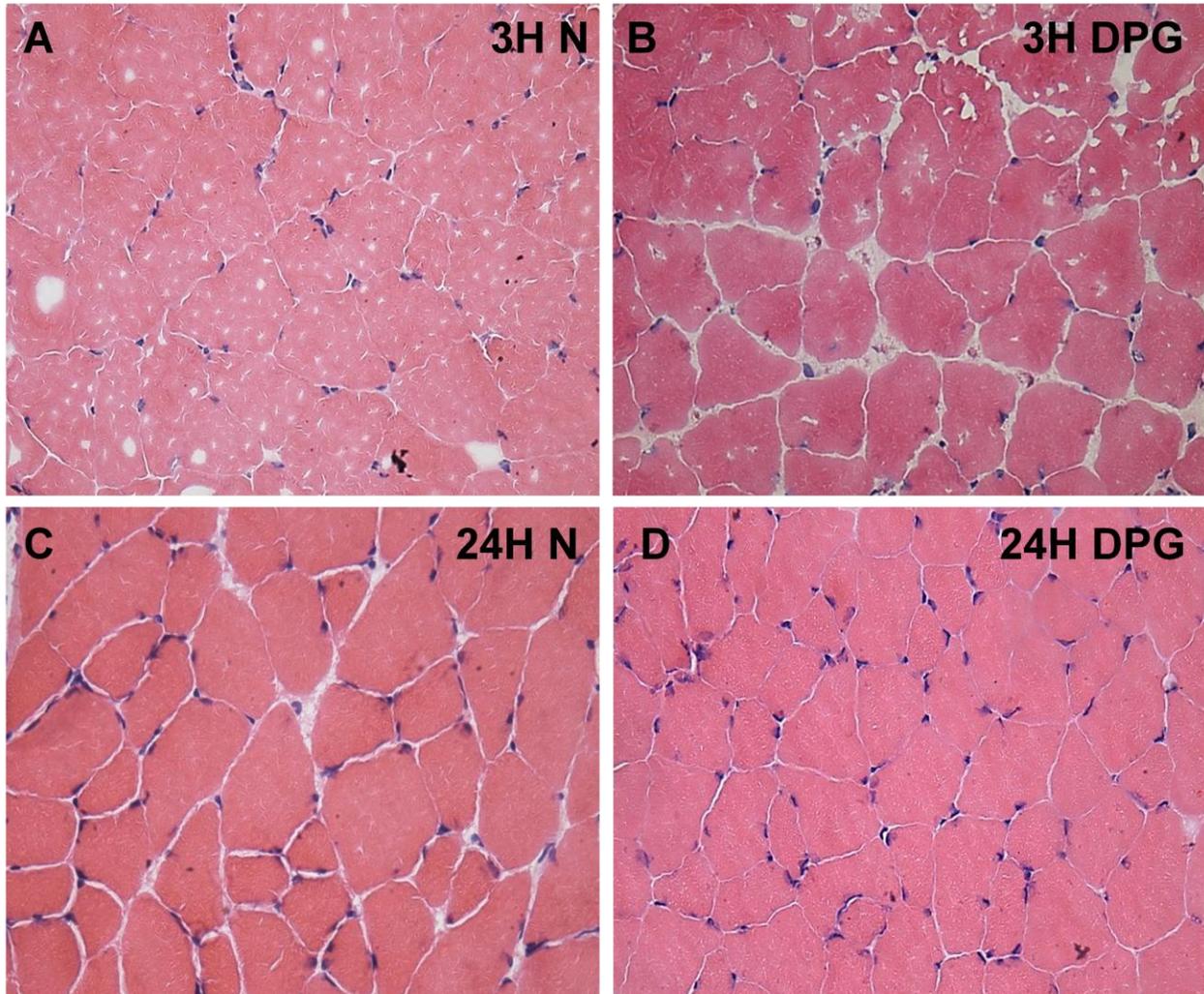
A análise *in vivo* do processo mionecrótico induzido pelo veneno da serpente *B. jararacussu*, demonstrou as principais características das fases que contemplam o processo da regeneração muscular (degenerativa e regenerativa), de acordo com as características histopatológicas observadas em diferentes tempos de sobrevivência após a inoculação do veneno em camundongos.

Os resultados obtidos na fase inflamatória estão expressos na tabela que se segue:

**Tabela 1.** Quantificação das alterações morfológicas observadas nas fibras musculares do músculo gastrocnêmio de camundongos sob a ação de veneno botrópico e a ação conjunta do DPG durante a fase inflamatória

VENENO (V)	Célula delta	Célula hipercontraída	Célula edemaciada	Célula <i>ghost</i>
3 horas	12,8%	31,9%	25,5%	29,8%
24 horas	21,4%	21,4%	42,9%	14,3%
3 dias	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%
7 dias	64,3%	9,5%	21,4%	4,8%
21 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>VENENO+DPG (VDPG)</b>				
3 horas	3,7%	25,9%	44,4%	25,9%
24 horas	25,0%	0,0%	75,0%	0,0%
3 dias	46,2%	23,1%	30,8%	0,0%
7 dias	25,0%	0,0%	75,0%	0,0%
21 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>NAÏVE (N)</b>				
3 horas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
24 horas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
7 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
21 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<b>GLICIRRIZINATO (DPG)</b>				
3 horas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
24 horas	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
7 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
21 dias	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Conforme dados da **Tabela 1** a histologia do músculo gastrocnêmio nos animais pertencentes ao grupo N manteve-se inalterada ao longo dos tempos analisados (**Figura 10**); morfologia normal, com formato hexagonal, núcleo periférico, evidenciando a ausência de mionecrose.

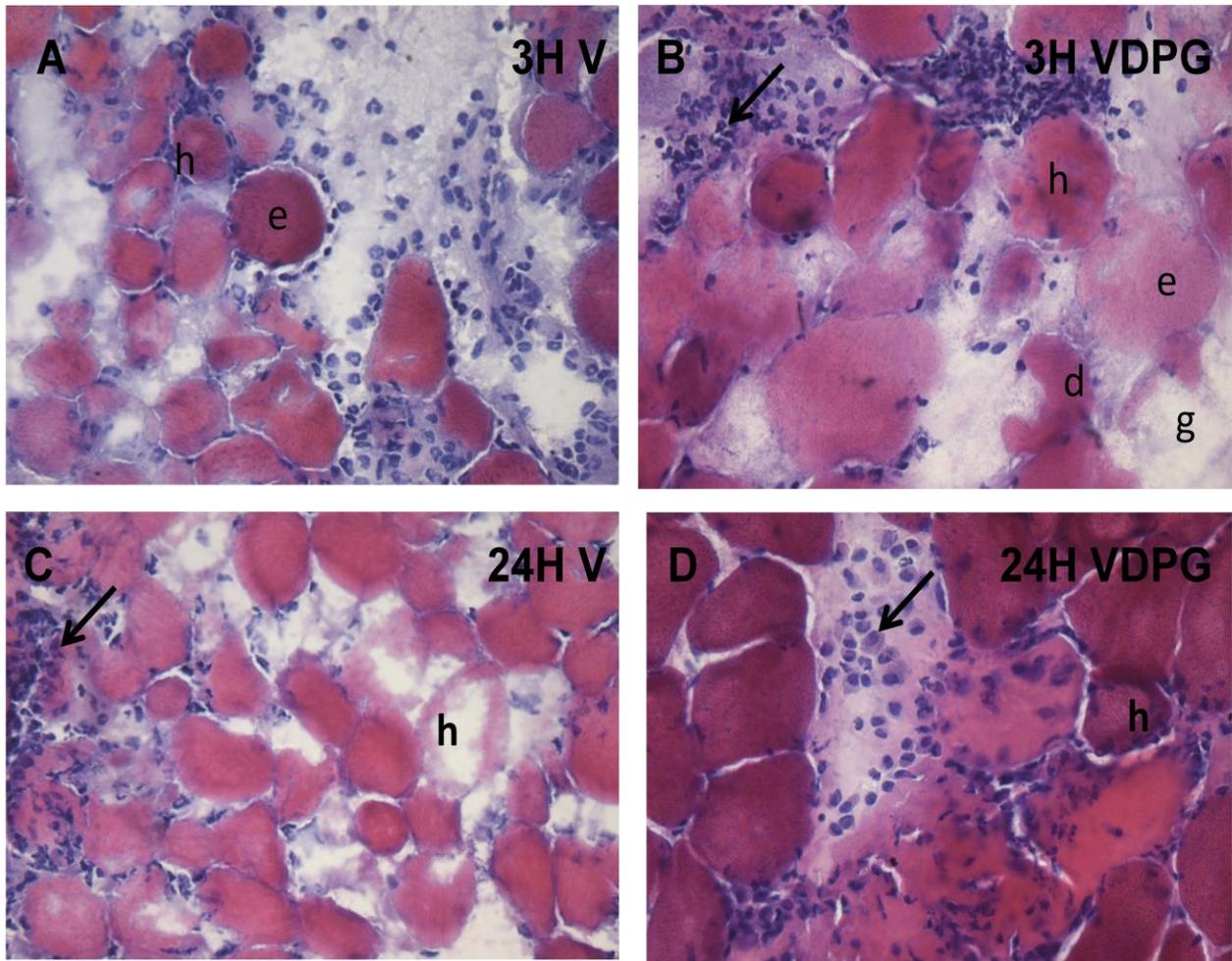


**Figura 10.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve (**A, C**) e tratados com DPG (**B, D**). Notar o padrão inalterado das fibras musculares estriadas esqueléticas com núcleo periférico e formato hexagonal, evidenciando a ausência de mionecrose. Aumento: 40x.

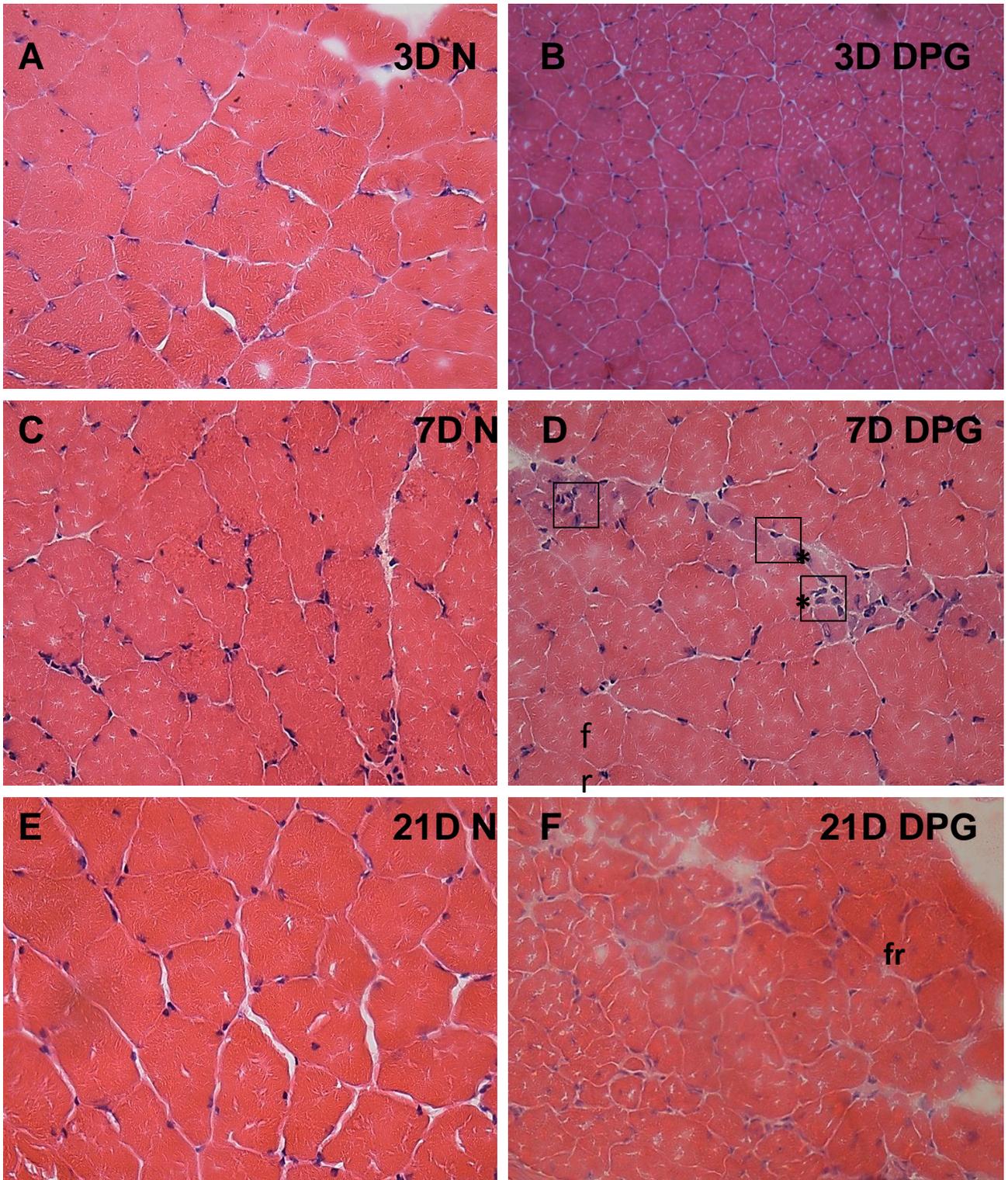
Pode-se observar também, a partir dos dados consignados na **Tabela 1**, que em todos os tempos de sobrevida o grupo V (100 µg/mL; 100 µL) e VDPG (100uL, 1,4mg/g), apresentou um número expressivo de alterações morfológicas (**Figura 11**). Após a lesão induzida pelo veneno da *B. jararacussu* os grupos **V** e **VDPG** nos tempos de 3 e 24 horas, apresentaram quadro de mionecrose intenso, caracterizado por infiltrado inflamatório, células hipercontraídas, hipercontraídas, células em delta, *ghost fibers* e edema. No grupo **VDPG**, aos 7 dias, houve maior infiltrado inflamatório, e nos tempos de sobrevida 7 e 21 dias, a fase final da regeneração muscular, a presença de células multinucleadas com localização central.

Quanto à ação do Glicirrizinato Dipotássio, há evidências de sua relevância sobre os animais submetidos ao envenamento botrópico: De fato, nas primeiras três horas após a inoculação experimental, o número de células *ghost* encontrado nos animais inoculados com veneno e DPG foi 15,1% inferior ao observado nos grupos inoculados apenas com veneno - 29,8% de células *ghost* encontradas em amostras sob ação do veneno, contra 25,9% sob ação de veneno e DPG. Esta relação é ainda maior para a observação de células hipercontraídas - a ação do DPG reduziu a observação de células deste tipo em 23,6%, resultados estes intimamente correlacionados com a inibição das citocinas TNF-α e IFN-γ, reduzindo a degeneração muscular. Quanto às células *ghost*, por fim, é importante verificar que a ação do DPG zerou sua observação a partir de 24 horas da ação do referido componente.

As observações para os grupos **DPG** e **N** corroboram com a ausência de efeito miotóxico do Glicirrizinato Dipotássio. Esses grupos não foram lesionados, conseqüentemente, sem regeneração, entretanto, ao observar a **Figura 12**, os grupos **DPG** 7 e 21 dias sugerem que o DPG é promotor de hiperplasia.



**Figura 11.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos durante a fase degenerativa (3 e 24 horas) tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (A, C), e posteriormente tratados com 2% de DPG (B, D). Em todas as imagens é possível observar mionecrose, com a presença de células edemaciadas (e) e hipercontraídas (h), lesão em delta (d), *ghost fibers* (g), além de intenso infiltrado inflamatório (seta). Aumento: 40x.



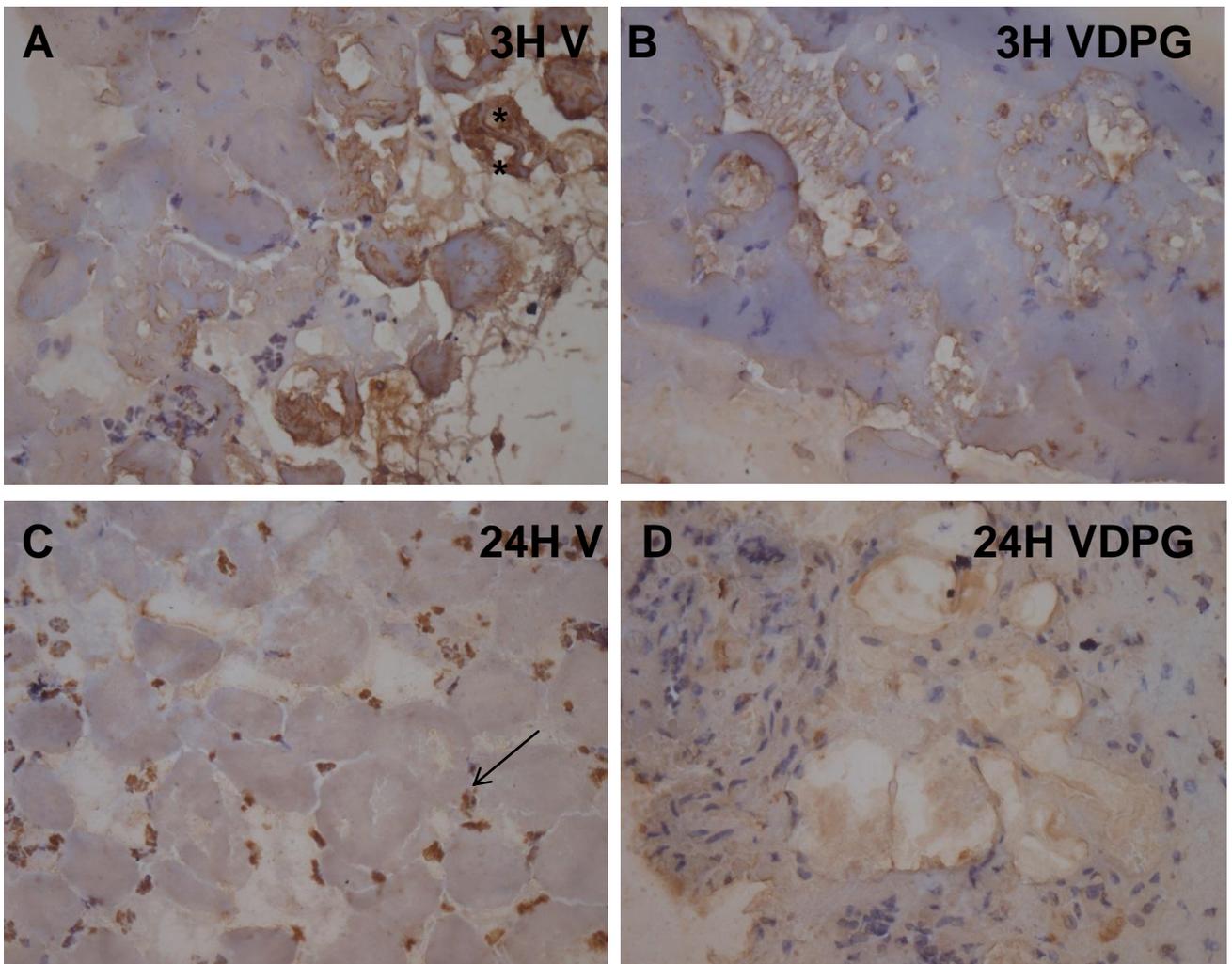
**Figura 12.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve (**A, C, E**) e tratados com **DPG (B, D, F)** após 3, 7 e 21 dias. Observar a ausência de lesão em todos os grupos. Notar a presença de células satélites (mioblastos (\*\*)) e fibras regeneradas (**fr**) nos grupos DPG 7 dias e 21 dias, respectivamente. Aumento: 40x.

Sabe-se que durante o processo de mionecrose, eventos moleculares como a ativação de citocinas são observados e corroboram com as alterações celulares. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  atuam paralelamente nas fases iniciais do envenenamento 3 horas, regeneração 7 dias, sendo este processo concluído após 21 dias.

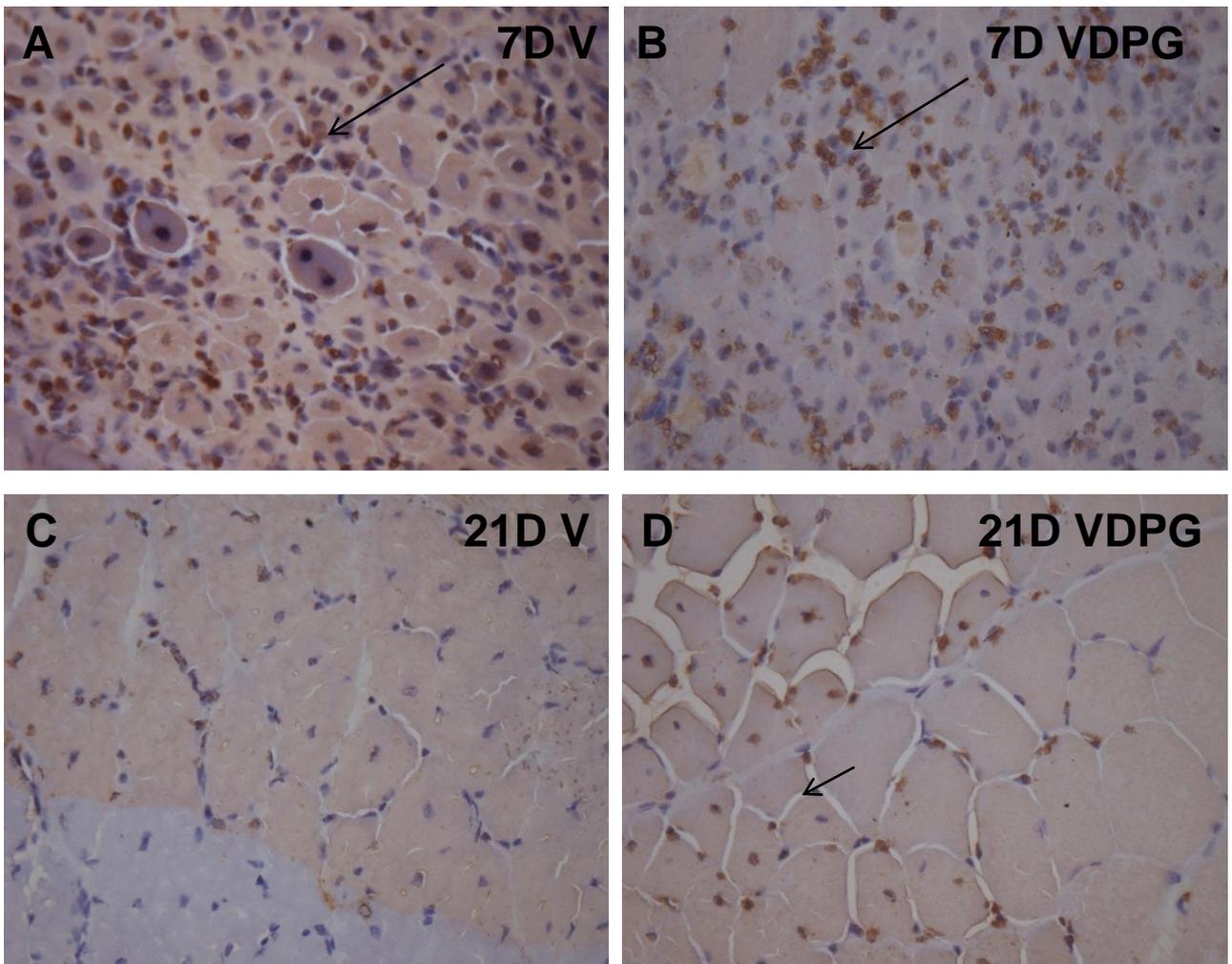
Dados da literatura descrevem a importância da presença de células inflamatórias para o processo de regeneração muscular (ARNOULD *et al.*, 2007). Os macrófagos podem secretar fatores pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, e esses últimos, regulam de forma sincrônica a miogênese em humanos (SACLIER *et al.*, 2012).

O ensaio imunohistoquímico para avaliar o IFN- $\gamma$  demonstrou marcação mais intensa para grupo **V** (3 horas e 24 horas) nas fibras musculares (**Figura 13A**) e no tecido conjuntivo (**Figura 13C**). Nos grupos **V** e **VDPG** para os tempos de sobrevivência (7 e 21 dias), observa-se marcação mais intensa aos 7 dias (**Figura 14C**) e marcação fraca aos 21 dias (**Figura 14F**). Para os grupos **N** e **DPG** a marcação é observada apenas entre as fibras musculares (**Figura 15**).

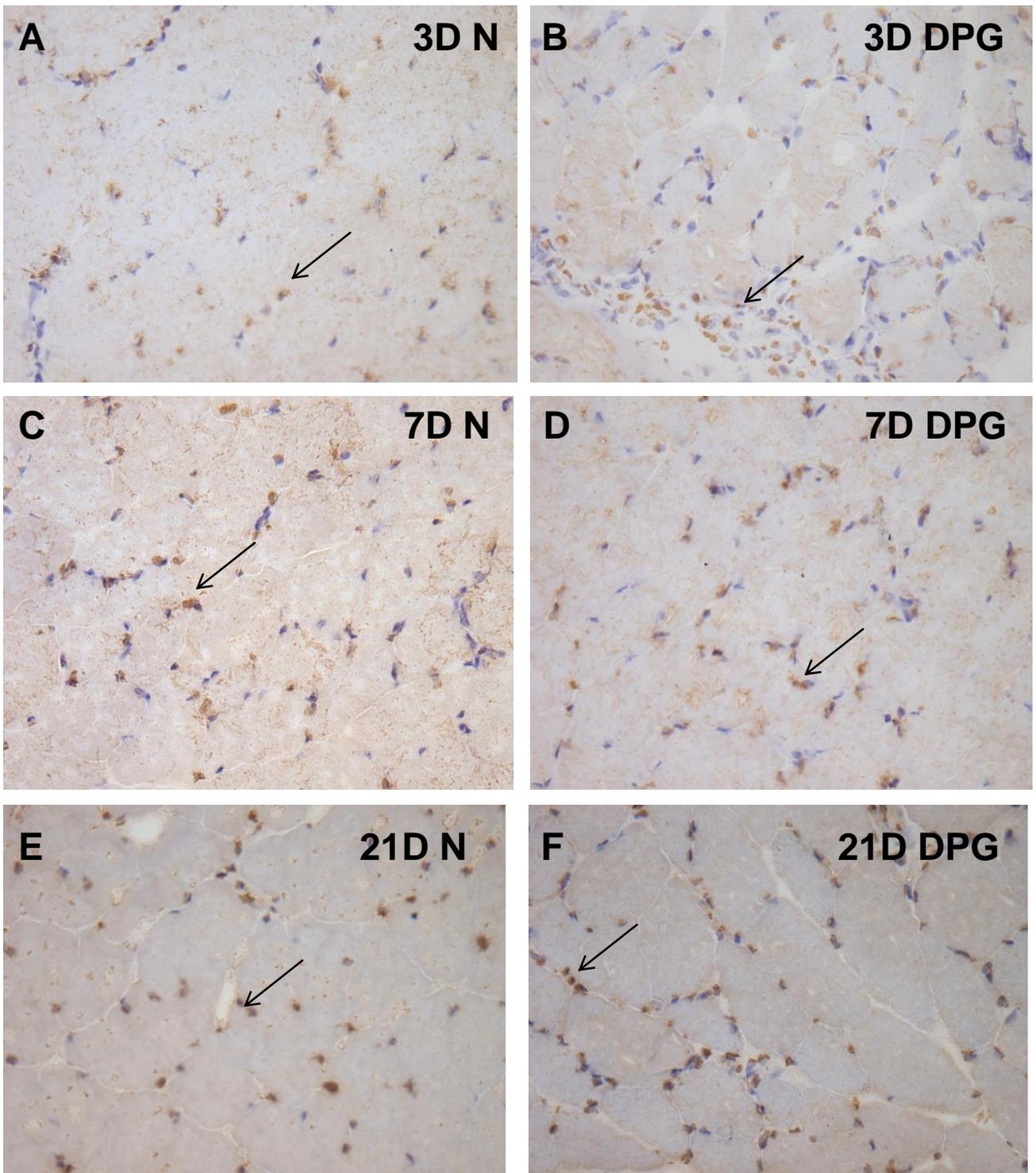
A marcação do TNF- $\alpha$  é mais intensa no grupo **V** para 3 e 24 horas na região do infiltrado inflamatório (**Figura 16A; 16C**) e no tecido conjuntivo no grupo **VDPG** (**Figura 16D**). Para os tempos de sobrevivência 3, 7 e 21 dias, fase regenerativa, a marcação de TNF- $\alpha$  somente é observada na região do tecido conjuntivo, nos grupos **V** e **VDPG**.



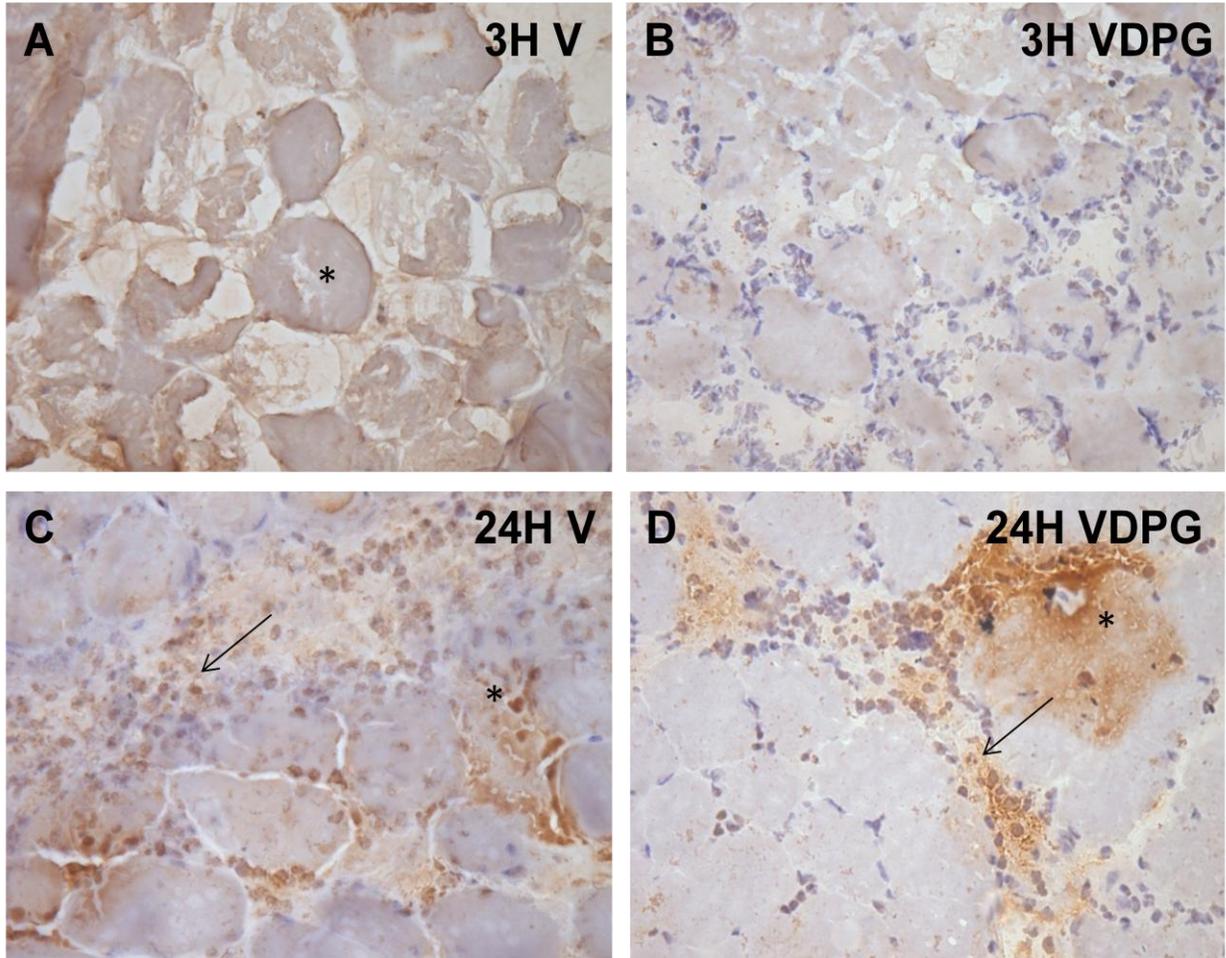
**Figura 13. Imunohistoquímica para expressão de IFN- $\gamma$ .** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (**A, C**), e posteriormente tratados com 2% de DPG (**B, D**), após 3 e 24 horas. A marcação é mais intensa, nas fibras musculares estriadas esqueléticas (\*), para o grupo veneno após 3 e 24 horas (**A, C**) e no tecido conjuntivo, entre as fibras, após 24 horas, para ambos os grupos (**seta**). Aumento 40X.



**Figura 14. Imunohistoquímica para expressão de IFN- $\gamma$ .** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (**A, C**), e posteriormente tratados com 2% de DPG (**B, D**), após ,7 e 21 dias. A marcação é mais intensa após 7 dias, entre as fibras musculares estriadas esqueléticas (**seta**). Aumento 40X.



**Figura 15. Imunohistoquímica para expressão de IFN- $\gamma$ .** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve (N) (A, C, E) e tratados com DPG (B, D, F). A marcação para IFN- $\gamma$  é observada apenas entre as fibras musculares estriadas esqueléticas (**seta**). Aumento 40x.



**Figura 16. Imunohistoquímica para expressão TNF- $\alpha$ .** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (A, C,) e posteriormente tratados com 2% de DPG (B, D), após 3 e 24 horas. A marcação é mais intensa, nas fibras musculares estriadas esqueléticas (\*), para o grupo veneno após 3 e 24 horas (A, C) e no tecido conjuntivo, entre as fibras, após 24 horas, para ambos os grupos (seta). Aumento 40X

Considerando a ação do DPG, na fase de regeneração, sobre células satélites, mioblastos e miotubos, temos a **Tabela 2**, que se segue:

**Tabela 2.** Quantificação das células satélites, mioblastos e miotubos observados no músculo gastrocnêmio de camundongos sob a ação de veneno botrópico e a ação conjunta do DPG durante a fase regenerativa.

VENENO (V)	Célula satélite	Mioblasto	Miotubo
3 dias	75,5%	24,5%	0,0%
7 dias	55,5%	36,8%	7,7%
21 dias	58,6%	34,9%	6,5%
VENENO+DPG (VDPG)			
3 dias	42,6%	57,4%	0,0%
7 dias	48,3%	32,8%	18,9%
21 dias	34,0%	30,4%	35,6%
NAÏVE (N)			
3 dias	0,0%	0,0%	0,0%
7 dias	0,0%	0,0%	0,0%
21 dias	0,0%	0,0%	0,0%
GLICIRRIZINATO (DPG)			
3 dias	0,0%	0,0%	0,0%
7 dias	41,4%	48,3%	10,3%
21 dias	45,8%	30,6%	23,6%

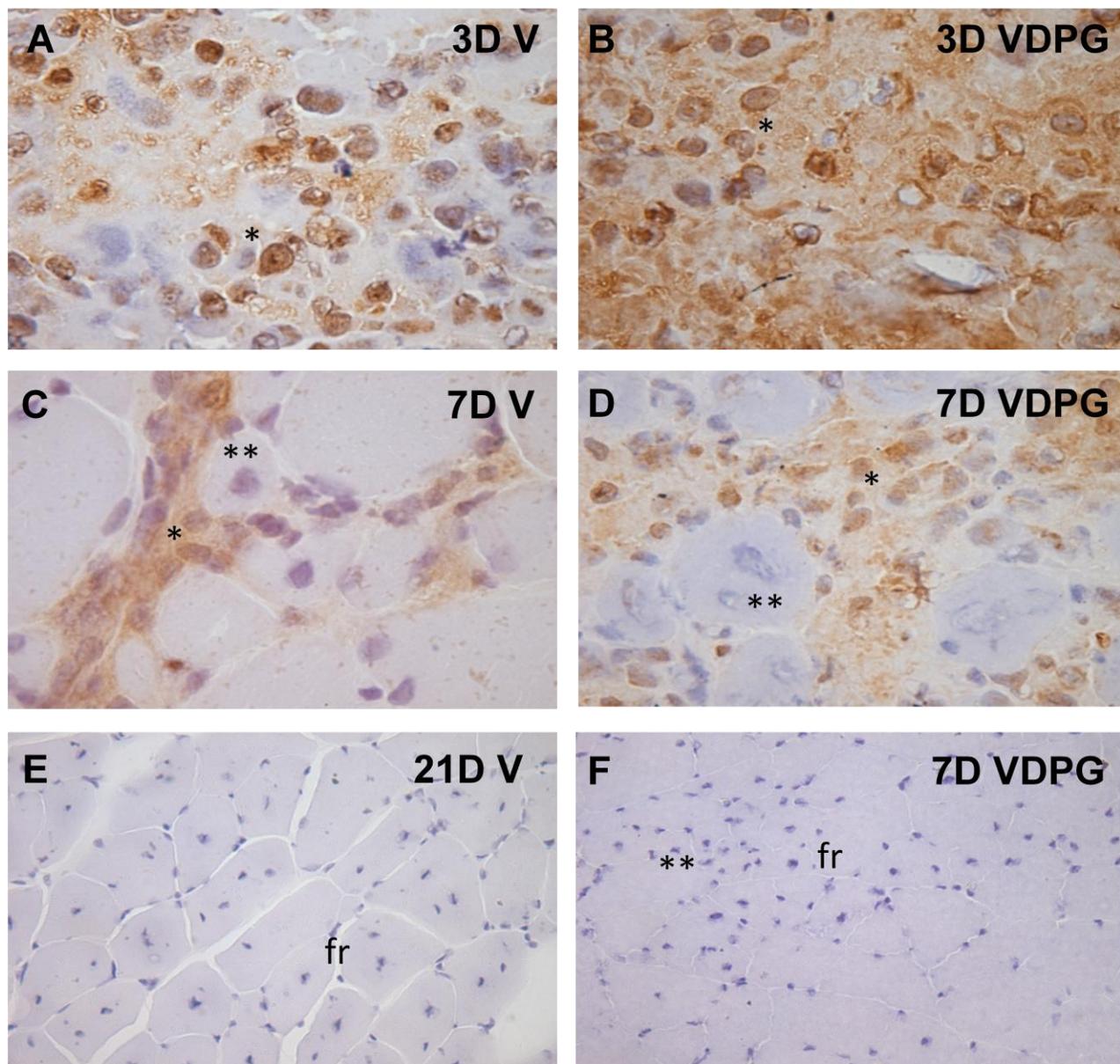
Pode-se observar, a partir dos dados elencados na **Tabela 2**, que há um relevante efeito do Glicirrizinato Dipotássio no sentido de acelerar os efeitos de regeneração de fibras musculares dos animais inoculados com veneno botrópico. Efetivamente, a concentração de miotubos nos animais posteriormente tratados com DPG foi 5,47 vezes maior em relação àqueles inoculados apenas com veneno, indicando o aumento na regeneração celular, através da iniciação da expressão de myoD. Do mesmo modo, observou-se o surgimento de miotubos inclusive em indivíduos inoculados apenas com DPG, indicando uma ação importante sobre tais estruturas musculares mesmo fora de situações de envenenamento e toxicidade.

Após a lesão muscular, células satélites ativadas expressam a proteína myoD, e posteriormente a proteína miogenina, sendo assim, grupos foram avaliados em

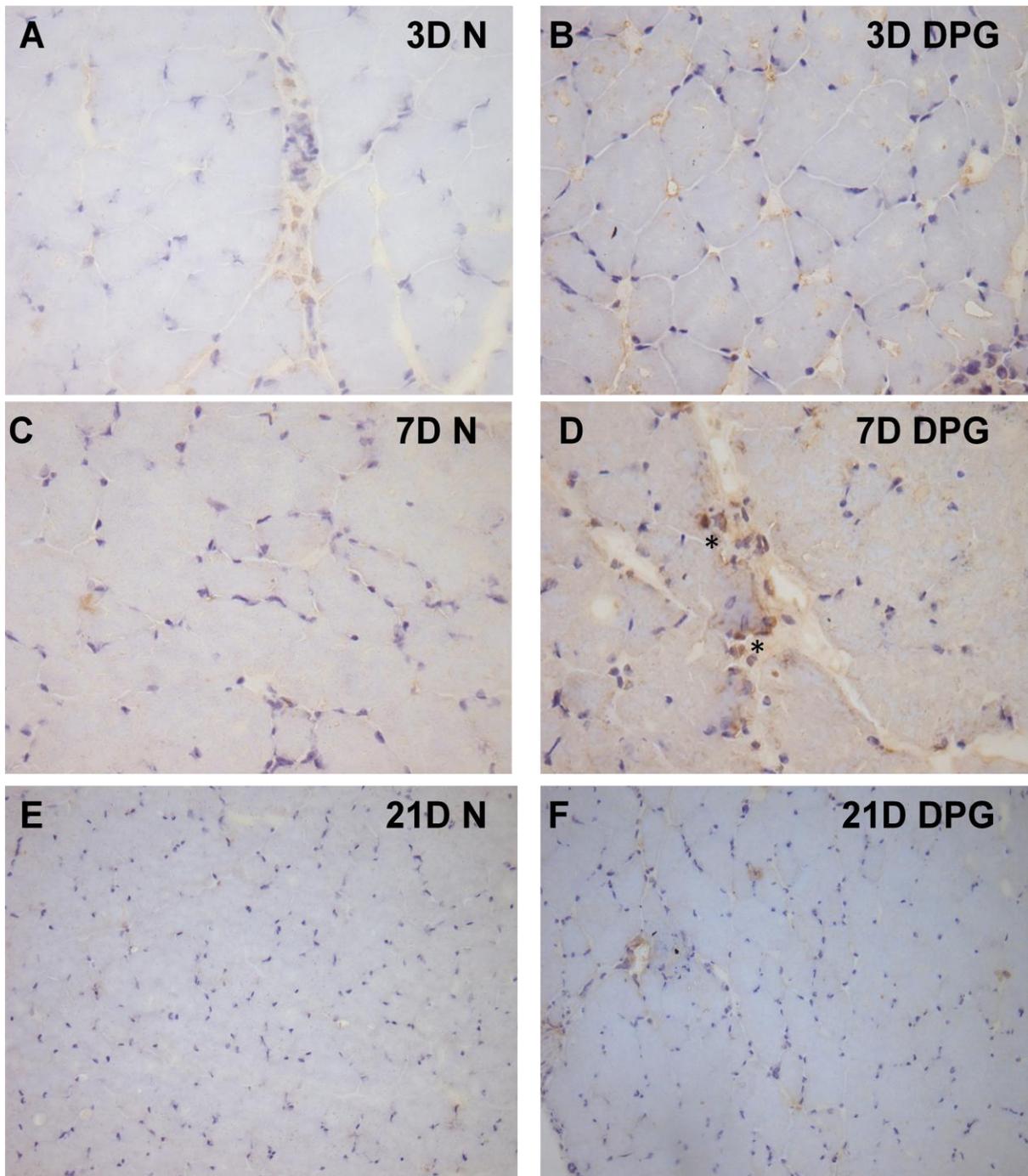
diferentes tempos de sobrevivência.

A imunohistoquímica para avaliar a marcação da myoD nos músculos gastrocnêmios de camundongos após envenenamento botrópico, reforça que o glicirrizinato dipotássio é promotor da regeneração muscular.

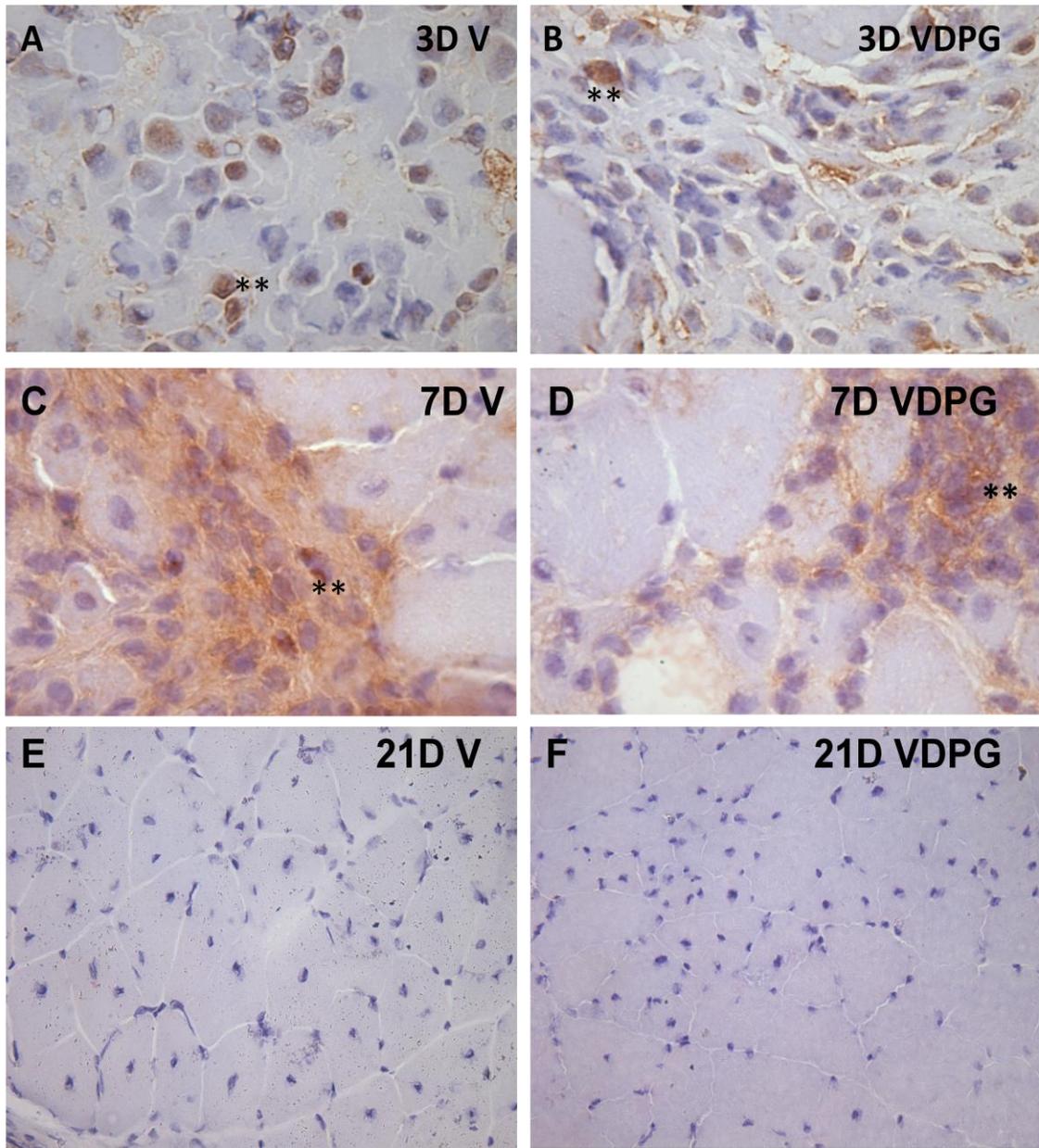
A marcação de myo D foi positiva na fase regenerativa em todos os tempos de sobrevivência (**Figura 17**), qualitativamente mais evidente no grupo **VDPG (Figura 17B)**. Os grupos **N** e **DPG** apresentaram fraca marcação, sendo essas apenas na região das células satélites (**Figura 18D**). A marcação para a proteína miogenina foi imunopositiva nos grupos **V** e **VDPG**, qualitativamente mais evidente nos tempos de sobrevivência 3 e 7 dias (**Figura 19B; 19D**). Não há expressão de miogenina nos tempos de sobrevivência 21 dias nos grupos **V** e **VDPG**. Os grupos **N** e **DPG** a expressão da miogenina ocorre somente na região de *spindle cells* e fraca marcação para 21 dias (**Figura 20**).



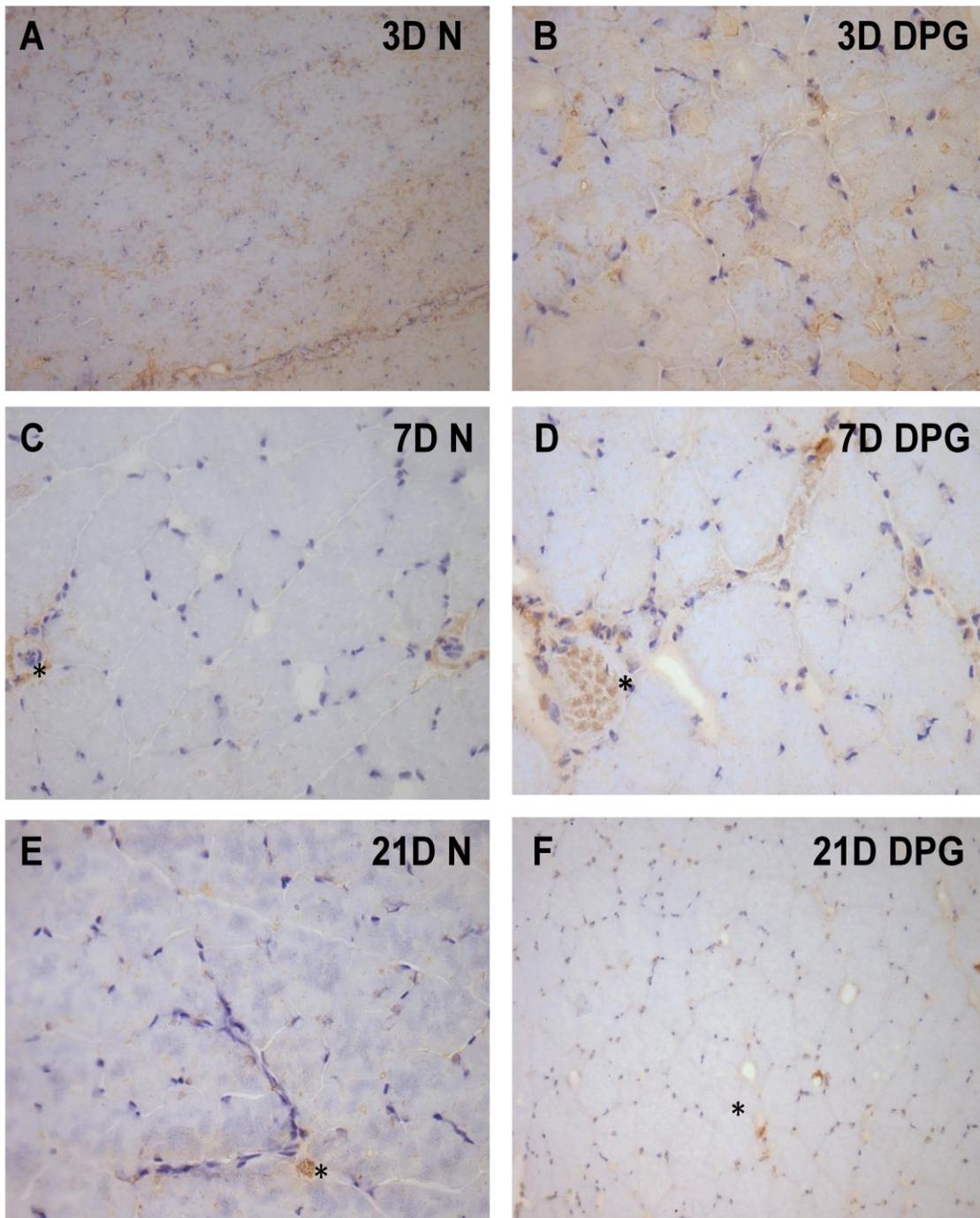
**Figura 17. Imunohistoquímica para expressão de myoD.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (A, C, E), e posteriormente tratados com 2% de DPG (B, D, F). Em todas as imagens é possível observar a marcação de myoD nos mioblastos durante o processo de regeneração muscular. Notar a presença de miotubos (\*\*) e fibras regeneradas (fr). A marcação é qualitativamente mais intensa após 3 dias, para o grupo DPG e ausente, após 21 dias, para ambos os grupos. É possível observar a presença de miotubos ainda após 21 dias, no grupo VDPG. (D, F) Aumento: 40x; E-F Aumento: 20x.



**Figura 18. Imunohistoquímica para expressão de myoD.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos naïve (A,C,E) e tratados com DPG (B, D, F). Notar a presença de mioblastos (\*) no grupos DPG 7 dias Aumento: 40x.



**Figura 19. Imunohistoquímica para expressão de miogenina.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com 100mg/mL do veneno de *B. jararacussu* (A, C, E), e posteriormente tratados com 2% de DPG (B, D, F). Observar a marcação de miogenina (\*\*) durante o processo de regeneração muscular. Aumento: 40x.



**Figura 20. Imunohistoquímica para expressão de miogenina.** Cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos 7 dias naïve (**A,C,E**) e após terem sido tratados com 2% de DPG (**B,D,F**). Há marcação positiva para miogenina apenas na região de *spindle cells* (\*), para o grupo DPG. Fraca marcação para 21 dias (**E, F**). Aumento: 40x.

## 7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados no trabalho apontam para a eficácia do Glicirrizinato Dipotássio (DPG) como agente coadjuvante à soroterapia no tratamento de processos de mionecrose desencadeada por envenenamento causado por *Bothrops jararacussu*.

Sua ação anti-inflamatória faz do Glicirrizinato Dipotássio um eficiente elemento para o controle dos efeitos adversos associados ao envenenamento botrópico, uma vez que, de acordo com os resultados observados, em sua presença há uma diminuição de células lesadas, como por exemplo, as células delta e, aumento das células satélites (hiperplasia muscular); estas são de grande importância para todo o processo, pois é a partir de sua ativação que ocorre a diferenciação celular que leva à regeneração tecidual, além da observação da diminuição do infiltrado inflamatório e da expressão de citocinas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.; MAGALHÃES, R.A.; dos REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R. Acute kidney failure secondary to ophidian bothropic and crotalid accidents. Analysis of 63 cases. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v.28, p.220-227, 1986.

ARNOULD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; BABA-AMER, Y.; ROOIJEN, N.V.; PLONQUET, A.; GHERARDI, R.K.; CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med**. v.204, p.1057–1069, 2007.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**. v.23, n.4, p.631-6, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M.M. de; CUPO, P.; HERING, S.E. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas**. In: Simpósio Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas. Medicina. v. 36, p.480-489. Ribeirão Preto: abr./dez., 2003.

BADILLO, J.J.G.; AYESTARAN, E.G. **Fundamentos do treinamento de força**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

BALDWIN, K.M.; HADDAD, F. Skeletal Muscle Plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. **Am J Phys Med Rehabil**. v. 81, (Suppl), p.S40-S51, 2002.

\_\_\_\_\_, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v.51, p.1236–1244, 2008.

BERNARDE, P.S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gaz. méd. Bahia**. v.81, n.1, jan./jun., p.55-63, 2011.

BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. Brazilian reptiles – Lists of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. 2012. Disponível em: <[http://www.sbherpetologia.org.br/lista\\_repteis/ListaRepteis30Setembro2012-PORTUGUES.pdf](http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis/ListaRepteis30Setembro2012-PORTUGUES.pdf)>. Acesso em: 03 mai. 2014.

BILATE, A.M.B.  
terapêuticas. **Rev Reumatologia clínica**, v.8, n.2, 2007.

, v.19, p 7-16, 2003.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª ed. Caderno 14. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRAZIL, V. Serumtherapia antiophidica. **Rev. Med. S. Paulo**. v.12, p.293-307, 1909.

BRINKHOUS, K.M.; READ, M.S.; FRICKE, W.A.; WAGNER, R.H. Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proc of Natl Acad Sci USA**, v.80, p 1463-1466, 1983.

CARDOSO, D.F.; YAMAGUCHI, M. Antitoxinas e perspectivas de modernização da terapia antiofídica. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MALÁQUE, C.M.S., HADDA, Jr., V. (Eds.), **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia e Tratamento**. p. 367-379, 2003.

CARDOSO, J.L.C.; BRANDO, R.B. **Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento**. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 1982.

CARREIRO, R.S.; COGO, J.C.; PRIANTI Jr., A.C.G. Estudo da Miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*: análise quantitativa de fibras lesadas. In: IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E V ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO – UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA. 2009, São José dos Campos. **Programas e Anais de Resumos**. São José dos Campos: Univap, 2009.

CEC EDITORE. **DIPOTASSIO GLICIRRIZINATO**: antinfiammatorio per pelli sensibili da Maruzen Pharmaceuticals - Prodotti Gianni. 24 de junho de 2013. Disponível em: <<http://cec-editore.com/component/k2/25-dipotassio-glicirrinato/25-dipotassio-glicirrinato>>. Acesso em: 05 jul. 2014.

CHARGÉ, S.P.B; RUDNICK, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**. v.84, p.209-238, 2004.

CHEN, S.H.; GERKEN, E.; ZHANG, Y.; ZHAN, M.; MOHAN, R.K.; LI, A.S.; REID, M.B., LI, Y.P. Role of TNF- $\alpha$  signaling in regeneration of cardiotoxin injured muscle. **Am. J. Physiol Cell Physiol**, v.289, p.C1179-C1187, 2005.

CHENG, M; NGUHEN, M.H; FANTUZZI, G. Endogenous interferon gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. **Am J Physiol Cell Physiol** v.294, p.C1183-C1191, 2008.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bull World Health Organ**, v.5, p.515-524, 1998.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-1: amino acid sequence and function. **J. Prot. Chem.**, v.12, p.57-64, 1993.

COSSU, G.; BIRESSI, S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: Possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. **Semin Cell Dev Biol**, v.16, p.623–631, 2005.

DHAWAN, J.; RANDO, T.A. Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. **Trends Cell Biol**, v.15, p.666–673, 2005.

principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*.  
v.34, n.2, p.77-83, 1992.

FELLIPPE, J.J. Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) e câncer: inibição da proliferação celular maligna com aumento drástico da apoptose. **Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar**. Biblioteca de Câncer. Disponível em [www.medicinacomplementar.com.br](http://www.medicinacomplementar.com.br). Acessado em 12 de setembro de 2013.

FOSTER, W.; LI, Y.; USAS, A. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. **J Orthop Res**. v.21, p.798-804, 2003.

FUCHTBAUER, E.M.; WESTPHAL, H. MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Dev Dyn**, v.193, p.34–39, 1992.

FUKUDA, T.Y. **Modulação de processos inflamatórios *in vivo* sob ação do laser de baixa intensidade em camundongos**: citocinas pró e anti-inflamatórias. 2011. 50f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Paulo, Programa de pós-graduação em Cirurgia e Experimentação, São Paulo/SP.

GITIRANA, L.B. **Histologia**: conceitos básicos dos tecidos. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

GROUNDS, M.D.; GARRET, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell Tissue Res.** v.267, p.99–104, 1992.

GROUNDS, M.D.; YABLONKA-REUVENI, Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser**, v.3, p.210–256, 1993.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom. **Memórias do Instituto Butantan.** v.33, p.1405-1474, 2003.

\_\_\_\_\_. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** v.33, n.11, p.1405-1424, 1995.

GUTIERREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon.** v.42, n.8, p.915-931, 2003.

GUTIERREZ, J.M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II Phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon.** v.51, n.1, p.80-92, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

HALEVY, O.; PIESTUN, Y.; ALLOUH, M.Z.; ROSSER, B.W.; RINKRVICH, Y.; RESHEF, R.; ROZENBOIM, I.; WLEKLINSKI-LEE, M.; YABLONKA-REUVENI, Z. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. **Dev Dyn**, v.231, p.489–502, 2004.

HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J.H.; EDMONDSON, D.G.; VENUTI, J.M.; OLSON, E.N.; KLEIN, W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v.364, p.501-506, 1993.

HAWKE, T. GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol.** v.91, p.534– 551, 2001.

HOGUE, A.R.; ROMANO, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Mem. Inst. Butantan.** v.36, p.109-207, 1972.

HOLTERMAN, C.E.; RUDNICKI, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. **Semin Cell Dev Biol**, v.16, p.575–584, 2005.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F.H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J. Bone Joint Surg Am.** v.84a, p.822-832, 2002.

JARVINEN, T.A.; JARVINEN, T.L.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, H.; JARVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **Am J Sports Med.** v.33, n.5, p.745-64, 2005.

JARVINEN, T.A. Muscle strain injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.12, p.155-161, 2000.

JIMENEZ-PORRAS, J. M. **Reptile toxins**. In: Biolog Data Book, 2nd edn, Vol. II. P.697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), Bethesda, MD., U.S.A, 1973.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KANNUS, P. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.** v.13, p.150-154, 2003.

KASTURIRANTE, A.; WICKREMASINGHEW, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLO, D.G.; DE SILVA, A.; SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**; v.5: p.218,2008.

KELIC, S., OLSSON, T., KRISTENSSON, K., Interferon-gamma promotes proliferation of rat skeletal muscle cells in vitro and alters their AChR distribution. *J. Neurol. Sci.* 114, 62–67, 1993.

KHAN, H.; KHAN, A.Q.; LATEEF, A.; REHMAN, M.U.; TAHIR, M.; ALI, F.; HAMIZA, O.O.; SULTANA, S. Glycyrrhizic Acid Suppresses the Development of Precancerous Lesions via Regulating the Hyperproliferation, Inflammation, Angiogenesis and Apoptosis in the Colon of Wistar Rats. **PLoS One**, v. 8, p.e 56020, 2013.

KLOSA, J. Beitrag zur therapeutischen wirkung der inhaltstoffe von succus liquiritiae. **Pharm Ztg Ver Apotheker-Ztg** v.102, p.946-949, 1957.

KURU, S., INUKAI, A., KATO, T., LIANG, Y., KIMURA, S., SOBUE, G. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in regenerating muscle fibers in inflammatory and noninflammatory myopathies. **Acta Neuropathol.** v.105, p.217–224, 2003.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2001.

LIMA, R.R.; COSTA, A.M.R.; SOUZA, R.D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina.** v.21, n.2, p.29-34, 2007.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of Lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**. v.42, p.885-901, 2003.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: isolation and characterization of piranotoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n. 5, p. 615-626, 1995.

MANTEGAZZA, R. HUGHES, S.M; MITCHELL, D. Modulation of MHC class II antigen expression in human myoblasts after treatment with IFN-gamma. **Neurology**. v.41, p.1128-1132, 1991.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1477, p.146-156, 2000.

McDERMOTT, M.F. TNF and TNFr biology in health and disease. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. v.47, p.619-35, 2001.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, Luiz da Costa *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2010.

MESCHER, A.L.; NEFF, A.W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. v.93, p.39-66, 2005.

MORENO, E.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; TAVARES-NETO, J. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.38, n.1, p. 15-21, 2005.

MORESI, V; PRISTERÁ, A.; SCICCHITANO, B.M. TNF Inhibition of Skeletal Muscle Regeneration is Mediated by a Caspase Dependent Stem Cell Response. **Stem Cell**. v.26, p.997-1008, 2008.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparasion of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, p.713-723, 1991.

MOZZETA, C., CONSALVI, S., SACCONI, V., FORCALES, S.V., PURI, P.L., PALACIOS, D. Selective control of pax7 expression by TNF-activated p38a/polycomb repressive 2 (PRC2) signaling during muscle satellite cell differentiation. **Landes Bioscience. Cell cycle**. v.10, n.2, p.191-198, 2011.

NABESHIMA, Y.; HANAOKA, K.; HAYASAKA, M.; ESUMI, E.; LI, S.; NONAKA, I.; NABESHIMA, Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, v.364, p.532-535, 1993.

NAOUM, P.C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v.23, n.2, p.111-9, 2001.

NISHIJIMA, C.M. **Caracterização do efeito anti-inflamatório e anti-hemorrágico dos extratos e frações enriquecidas de espécies vegetais do projeto temático BIOTA/FAPESP.** 2010. 106f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP.

PASCHALIS, V.; KOUTEDAKIS, Y.; JAMURTAS, A.Z.; MOUGIOS, V. BALTZOPOULOS, V. Equal volumes of high and low intensity of eccentric exercise in relation to muscle damage and performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.19, n.1, p.184–188, 2005.

PATIÑO, A. C.; PEREAÑEZ, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Toxicon**, v. 63, p. 32-43, 2013.

PELLEGRINI FILHO, A.; BRAZIL, V. Origem da paralisia respiratória causada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. **Ciênc. Cultura**, v.28, p.199, 1976.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.47, n.1, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1770, p.585-593, 2007.

QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; FURTADO, M.F.D.; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon.** v.52, p.842-851, 2008.

REYES-REYNA, S.; KROLICK, K.A. Chemokine production by rat myocytes exposed to interferon- gamma. **Clin Immunol.** v.94, p.105-113, 2000.

RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; PIRES DE CAMPOS, V.A. F.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRÃO, M.L.; JORGE, M.T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Rev Ass Med Brasil.** v.44, p.312-318, 1998.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.30, p.475-480, 1997.

ROCHA, T. **Ação do Mastoparano *Polybia* – MPII nas fibras musculares e na junção neuromuscular:** Um estudo morfológico, imunohistoquímico e biofísico. 2008. 125f.

Tese (Doutorado em Biologia Celular). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas/SP.

\_\_\_\_\_. Inflammations and apoptosis induced by mastoparan Polybia-MPII on skeletal muscle. **Toxicon**, v.15, n.7, p.1213-1221, 2010.

\_\_\_\_\_. Mastoparan effects in skeletal muscle damage: An ultrastructural view until now concealed. **Microscopy Research and Technique**, v.71, n.3, p.220-229, 2008.

\_\_\_\_\_. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v.50, n.5, p.589-599, 2007.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Interlivros, Cap. 2-3, 1988.

SABOURIN, L.A.; GIRGIS-GABARDO, A.; SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M.A. Reduced Differentiation Potential of Primary *MyoD*<sup>-/-</sup> Myogenic Cells Derived from Adult Skeletal Muscle. **J Cell Biol**, v. 144, p.631–643, 1999.

SACLIER, M., YACOUB-YOUSSEF, H.; MACKEY, A.L.; ARNOULD, L.; ARDJOUNE, H.; MAGNAN, M.; SAIHLA, F.; CHELLI, J.; PAVLATH, G.K.; MOUNIER, R.; KJAER, M.; CHAZAUD, B. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. **Stem Cells**. v:1, p.25, 2012.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZA, J.I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v.57, p.627-645, 2011.

SALEEM, M.M.N.M.; MOHAMMAD, A.A.W.; AL-TAMEEMI, J.A.; SULAIMAN, G.M. Biological study of the effect of licorice roots extract on serum lipid profile, liver enzymes and kidney function tests in albino mice. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n.59, p.12702-12706, out., 2011.

SCHRÖFELBAUER, B.; RAFFETSEDER, J.; HAUNER, M.; WOLKERSTORFER, A.; ERNST, W.; SZOLAR, O.H. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem J.*, v. 421, p. 473-482. **Erratum in Biochem J**, v.422, p.571, 2009.

SHÄFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **British Journal of Surgery**. v.85, p.444-460, 1998.

SHARMA, R; ANKER, S.D. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. **Int J Cardiol**. v.85, p.161-171, 2002.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D.P.; RICHARDSON, J.B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev Biol**, v.294, p.50–66, 2006.

SHI, X.; GARRY, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes Dev**, v.20, p.1692–708, 2006.

SHIBATA, A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice, **Yakugaku Zasshi**, v.120, n.10, p. 849–862, 2000.

SHIM, J-Y.; YIM, S-B.; CHUNG, J-H.; HONG, K.S. Antiplatelet and antigingivitis effects of a mouthrinse containing cetylpyridinium chloride, triclosan and dipotassiumglycyrrhizinate. **J Periodontal Implant Sci**, v.42, p.33–38, 2012.

SILVEIRA, G.F.; MARTINS-NETO, R.G. A interferência humana na mudança dos padrões ecológicos e comportamentais das Serpentes: um problema de saúde pública. In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu: [...], 2007.

SZALAY, K.; RAZGA, Z.; DUDA, E. TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. **Eur J Cell Biol**. v.74, n.4, p.391-8, 1997.

TANG, B.; QIAO, H.; MENG, F.; SUN, X. Glycyrrhizin attenuates endotoxin- induced acute liver injury after partial hepatectomy in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.40, p.1637-1646, 2007.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y.; Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. v.42, p.947-962, 2003.

TEWS, D.S.; GOEBEL, H.H. DNA-fragmentation and expression of apoptosis related proteins in muscular dystrophies. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v.23, p.331-338, 1997.

TIDBALL, J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Med Sci Sports Exerc**, v.27, n.7, p.1022-1032, 1995.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.288, n.2, p.R345-53, 2005.

TOMITA, Y.; HASEGAWA, S. Multiple effects of interferon on myogenesis in chicken myoblast cultures. **Biochim Biophys Acta**. v.804, p.370-376, 1984.

TSETLIN, V.I.; HUCHO, F. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBS Lett**, v.557, p.9-13, 2004.

Van ROSSUM, T.G.J.; VULTO, A.G.; de MAN, R.A.; BROUWER, J.T.; SCHALM, S.W. Review article: glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v.12, p.199-205, 1998.

VORONOV, E.; APTE, R.N.; SOLER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. **J. Venom, Toxins**. v.5, p.5-33, 1999.

WARREL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW (eds). The venomous reptiles of the Western Hemisphere. **Cornell University Press**: New York, p. 709-715, 2004.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X.F.; ACHONG, M.K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clinical Invest**. v.101, p.311-20, 1998.

YABLONKA-REUVENI, Z.; PATERSON, B.M. MyoD and myogenin expression patterns in cultures of fetal and adult chicken myoblasts. **J Histochem Cytochem**, v. 49, p. 455–462, 2001.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A.J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. **Dev Biol**. v.64, p.588–603, 1994.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RUDNICKI, M.A.; RIVERA, A.J.; PRIMIG, M.; ANDERSON, J. E.; NATANSON, P. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. **Dev Biol**, v.210, p.440–455, 1999.

ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **J Histochem Cytochem**. v.54, n.11, p.1177-91, 2006.

ZAMMIT, P.S.; GOLDING, J.P.; NAGATA, Y.; HUDON, V.; PARTRIDGE, T.A.; BEAUCHAMP, J.R. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal. **J Cell Biol**, v.166, p.347–357, 2004.

ZYCHAR, B.  
*jararaca*:

-

***Bothrops***

/SP.