

RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI

**“PAPEL DA HEME-OXIGENASE NA AÇÃO DA
PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu*”**

CAMPINAS

Unicamp

2008

RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI

**“PAPEL DA HEME-OXIGENASE NA AÇÃO DA
PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu*”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B479p Bifaroni, Renata Mano Scatamburlo
“Papel da heme-oxigenase na ação da peçonha de *Bothrops jararacussu*” / Renata Mano Scatamburlo Bifaroni. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Stephen Hyslop
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bothrops. 2. Heme Oxigenase (Desciclizante). 3. Monóxido de carbono. 4. Hemorragia. 5. Mionecrose. 6. Permeabilidade vascular. I. Hyslop, Stephen. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Role of heme oxygenase in the action of *Bothrops jararacussu* snake venom

- Keywords:**
- Bothrops
 - Heme oxygenase (Descyclizing)
 - Carbon monoxide
 - Hemorrhage
 - Myonecrosis
 - Vascular permeability

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Data da defesa: 27 - 08 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Handwritten signatures of the examiners are present to the right of their names. The signature for Prof. Dr. Stephen Hyslop is at the top, followed by the signature for Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira, and the signature for Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling at the bottom.

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 27/08/2008

DEDICATÓRIA

A Deus que me conferiu o dom da vida. Sua presença faz-me seguir em frente, com fé e coragem, porque sei que existe dentro de mim um poder infinito que me protege e me impele para a auto-realização e prosperidade.

À minha mãe, pois seu amor e dedicação fizeram-me nunca desistir de meus sonhos. Devo-lhe todas as minhas conquistas, o meu caráter, o meu amor e a minha vida.

Ao meu pai que em vida, tornou-se um exemplo de inteligência, amor, dedicação e estará presente para sempre em meu coração.

Ao meu marido: pelo amor, companheirismo, cumplicidade e por estar ao meu lado em todos os momentos, amo muito você.

À minha irmã: Exemplo a ser seguido. Presente de Deus em minha vida, obrigada pelo apoio, amizade e companheirismo sempre!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Stephen Hyslop pela oportunidade, dedicação, orientação e contribuição à minha formação científica.

À minha irmã de coração: Cássia, pelo incentivo, apoio e colaboração. Foi muito produtiva a nossa parceria e eterna é a nossa amizade!

Ao técnico José Ilton e a Maiara pela disponibilidade, colaboração, paciência e dedicação. Muito obrigado por tudo!

À Rafaela pelas valiosas colaborações, seu auxílio foi de suma importância na realização desse trabalho.

Aos amigos da Farmacologia Bioquímica: André, Adriana, Alessandra, Cássia, Christiane, Delano, Elionai, Érica, Fernanda, Gustavo, Juliana, Igor, Kiara, Lourdes, Mariana, Norma, Rafael, Raquel, Sueli, Thomaz, pela convivência, apoio, paciência e amizade demonstrada em todos os momentos.

À Carla e a Kiara pela colaboração nos experimentos de PCR e a Adriana pelo auxílio na redação do artigo.

À Priscila pela confiança e disponibilidade do micrótomo e a Chris pelos ensinamentos nos experimentos de histologia.

Aos amigos do departamento: Carol, Daniel, Enilton, Letícia, Nádia, Paula, Renata, Sandro, Tatiana e aos funcionários: Bruna, Elaine, Fran, Wanderlei pela amizade e auxílio em vários momentos.

À querida amiga Paula pelo apoio, confiança e amizade.

Aos colegas do Biotério: Marcos e “Seu” Miguel pelo auxílio e respeito aos animais e ao técnico Gildo que sempre disponibilizou seus animais em momentos indispensáveis no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas ministradas no decorrer do curso.

Ao Prof. Dr. Aurélio Vicente Graça de Souza da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) por fornecer informações importantes do ensaio enzimático realizado neste projeto.

À Dra. Maria Tereza Ribelo (IPEN, SP) pelo fornecimento de ¹²⁵I-albumina humana e ao Laboratório da Dra. Soraia K. P. Costa (Departamento de Farmacologia, ICB, USP, São Paulo) por ter ensinado a técnica de edema em camundongos.

Aos professores da banca de qualificação Dr. Edson Antunes, Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling e a Dra. Sisi Marcondes pelas valiosas sugestões.

Aos professores participantes dessa banca Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira e a Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling pelas contribuições nessa dissertação.

Ao meu cunhado José Luiz pelo apoio, amizade e por sempre poder contar com vc!

A toda a minha família e amigos que colaboraram com o apoio e incentivo para a realização desta etapa de minha vida.

À Fapesp e CNPq pelo auxílio financeiro.

E finalmente, a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e para a minha formação pessoal e profissional.

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

	PÁG.
RESUMO	<i>xiv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Heme-oxigenase	19
1.2- Produtos liberados pela HO	23
1.3- Dano local causados por peçonhas botrópicas	28
1.3.1- Hemorragia e hemorraginas.....	28
1.3.2- Edema.....	29
1.3.3- Mionecrose e miotoxinas.....	30
1.3.4- Regeneração muscular.....	31
1.4- <i>Bothrops jararacussu</i>	32
2- OBJETIVOS	35
3- MATERIAIS	36
3.1- Reagentes e peçonha	37
3.2- Animais	37
4- MÉTODOS	38
4.1- Permeabilidade vascular	39
4.2- Atividade hemorrágica	39
4.3- Mionecrose	40
4.3.1- Creatinoquinase (CK).....	40
4.3.2- Atividade da HO.....	40

4.3.3- Expressão gênica da HO-1 e HO-2: PCR em tempo real.....	42
4.3.4- Análise histológica.....	45
4.4- Tratamento com inibidor.....	45
4.5- Análise estatística.....	46
5- RESULTADOS.....	47
5.1- Permeabilidade vascular.....	48
5.2- Atividade hemorrágica.....	49
5.3- Mionecrose.....	53
5.3.1- Atividade enzimática da HO.....	53
5.3.2- Expressão gênica da HO-1 e HO-2 através do PCR em tempo real.....	53
5.3.3- Perfil de dano e regeneração muscular (histologia).....	55
5.4- Efeito do tratamento com o inibidor ZnDPBG sobre a mionecrose..	63
5.4.1- Atividade da HO.....	63
5.4.2- Atividade da creatinoquinase (CK).....	63
5.4.3- Análise histológica do dano muscular após tratamento com ZnDPBG.....	63
6- DISCUSSÃO.....	69
7- CONCLUSÃO.....	77
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

BR	bilirrubina
BV	biliverdina
BVR	biliverdina redutase
CK	creatinoquinase
CO	monóxido de carbono
cGMP	monofosfato de guanosina cíclico
DHM	dose hemorrágica mínima
Fe	ferro
GCs	guanilato ciclase solúvel
HE	hematoxilina eosina
HO	heme-oxigenase
IRP	proteína reguladora de ferro (<i>iron regulatory protein</i>)
i.d.	intradérmica
i.p.	intraperitoneal
L- NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
NO	óxido nítrico
PLA ₂	fosfolipase A ₂
VEGF	fator de crescimento derivado do endotélio
ZnDPBG	zinco deuteroporfirina 2,4-bis-glicol

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Sequências dos primers utilizados no PCR em tempo real.....	43

	PÁG.
INTRODUÇÃO	
Figura 1- Via de degradação do heme através da ação da HO.....	20
Figura 2- Localização celular da HO-1 e HO-2.....	23
Figura 3- Ações protetoras do CO derivado da degradação do heme.....	25
Figura 4- Ações protetoras do CO e dos pigmentos da bile.....	26
Figura 5- Efeitos benéficos e tóxicos do CO e da bilirrubina.....	27
RESULTADOS	
Figura 1- Efeito na permeabilidade vascular causado pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> e a influência do ZnDPBG e do L- NAME.....	50
Figura 2- Efeito na permeabilidade vascular causado pela peçonha de <i>B. jararacussu</i> no co-tratamento com L-NAME e ZnDPBG.....	51
Figura 3- Atividade hemorrágica da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e o efeito do ZnDPBG e do L-NAME.....	52
Figura 4- Atividade da HO em músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 25 µg e 75 µg da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	54
Figura 5- Expressão gênica da HO-1 e HO-2 em músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 75 µg da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	55
Figura 6- Análise histológica em músculo gastrocnêmio injetado com 25 µg e 75 µg da peçonha no dano e na regeneração muscular (coloração hematoxilina-eosina).....	57
Figura 7- Análise histológica em músculo gastrocnêmio injetado com 75 µg da peçonha (coloração vermelho picosirius).....	62

Figura 8-	Análise histológica em músculo gastrocnêmio injetado com 75 µg da peçonha (coloração vermelho picrosirius).....	63
Figura 9-	Efeito do ZnDPBG sobre a atividade enzimática da HO em músculo injetado com 75 µg da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	65
Figura 10-	Níveis de CK plasmático em camundongos injetados com 25 µg e 75 µg da peçonha de <i>B. jararacussu</i> e em camundongos injetados com 75 µg da peçonha e ZnDPBG.....	66
Figura 11-	Análise histológica da mionecrose e hemorragia em músculo injetado com 75 µg da peçonha na ausência e presença de ZnDPBG.....	67
Figura 12-	Análise histológica da mionecrose e hemorragia em músculo injetado com 75 µg da peçonha na ausência e presença de ZnDPBG.....	68

RESUMO



A heme oxigenase (HO) é uma enzima envolvida na degradação de grupos heme, levando à formação de biliverdina IX, ferro e monóxido de carbono. Em baixas concentrações, esses produtos exercem diversos efeitos protetores, inclusive antiapoptóticos, antiinflamatórios, antiproliferativos e antitrombóticos, enquanto, em concentrações elevadas, podem resultar em hipóxia, comprometimento neurológico, disfunções mitocondriais e hiperbilirrubinemia. Neste estudo, investigamos o envolvimento da HO no aumento da permeabilidade vascular, na hemorragia e na mionecrose causadas pela peçonha de *Bothrops jararacussu*. A peçonha de *B. jararacussu* (0,3-3 µg/sítio) aumentou a permeabilidade vascular no dorso de pele de camundongos. Este aumento foi inibido pelo zinco deuteroporfirina 2,4-bis-glicol (ZnDPBG), um inibidor não seletivo da HO, quando administrado i.p. (45 e 90 µmol/kg), mas não quando i.d. (25-200 nmol/sítio). O co-tratamento com o inibidor do óxido nítrico sintase, N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 nmol/sítio), não potencializou a inibição por ZnDPBG. ZnDPBG (45 ou 90 µmol/kg, i.p.) não reduziu a hemorragia na pele (3 e 10 µg de peçonha/sítio), mas aumentou esta resposta na dose maior. A peçonha (25 µg e 75 µg) aumentou a atividade da HO em músculo gastrocnêmio de camundongos em dois momentos – um precoce (nas primeiras horas após o envenenamento – fase de lesão aguda) e um tardio (alguns dias após a injeção de peçonha, fase de regeneração muscular). Na dose de 75 µg da peçonha, ocorreu aumento da expressão gênica da HO-1, entre 3 e 12 horas após o envenenamento, com pouca alteração na expressão da HO-2. As alterações histológicas causadas pela peçonha (25 µg e 75 µg) consistiram de três fases: fase 1 (até 6 h ou 12 h pós-peçonha – p.p.), caracterizada por hemorragia e mionecrose, fase 2 (de 12 h a 72 h p.p.), caracterizada por um extenso infiltrado inflamatório e fase 3 (7-28 dias p.p.), caracterizada por células regenerativas e maior deposição de colágeno ao redor destas células. O tratamento com ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.), 15 minutos após a injeção da peçonha (75 µg), inibiu parcialmente a mionecrose, diminuindo também os níveis de CK nas primeiras horas (1-3 h) pós-peçonha. Estes resultados indicam um envolvimento da HO no edema e na mionecrose causadas pela peçonha de *B. jararacussu*, e mostram que a inibição desta atividade com ZnDPBG pode proporcionar alguma proteção contra esses efeitos locais.

ABSTRACT



Heme-oxygenase (HO) is an enzyme involved in the degradation of heme groups that results in the formation of biliverdin IX, iron and carbon monoxide. At low concentrations, these reaction products have anti-apoptotic, anti-inflammatory, anti-proliferative, and anti-thrombotic activities, whereas at high concentrations they can cause hypoxia, neurological damage, mitochondrial dysfunction and hiperbilirrubinemia. In this study, we investigated the involvement of HO in the increase in vascular permeability, hemorrhage and myonecrosis caused by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Bothrops jararacussu* venom (0.3-3 µg/site) increased the vascular permeability in mouse dorsal skin. This increase was inhibited by zinc deuteroporphyrin 2,4-bis-glycol (ZnDPBG), a non-selective HO inhibitor, when administered i.p. (45 and 90 µmol/kg). In contrast, ZnDPBG given i.d. (25-200 µmol/site) did not affect the increase in vascular permeability. Co-treatment with the nitric oxide synthase inhibitor N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 nmol/site) did not potentiate the inhibition by ZnDPBG. ZnDPBG (45 or 90 µmol/kg, i.p.) did not reduce the dorsal skin hemorrhage (3 and 10 µg of venom/site), but rather, increased this response at the highest dose. Venom (25 and 75µg) increased the HO activity of mouse gastrocnemius muscle. The increase in activity was biphasic and included early (first few hours after envenoming, corresponding to acute damage) and late (7-18 days after envenoming – muscle regeneration) phases. Enhanced gene expression of HO-1 was seen 3-12 h after envenomation (75 µg), with little change in HO-2 expression. Histological analysis showed that the muscle damage consisted of three phases: phase 1 (up to 6-12 h post-venom), characterized mostly by hemorrhage and myonecrosis, phase 2 (12-72 h post-venom), characterized by an extensive inflammatory infiltrate, and phase 3 (7-28 days post-venom), characterized mainly by regenerative cells and an increase in collagen deposition around these cells. Treatment with ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.) 15 min after venom (75 µg) injection partially attenuated the myonecrosis and also decreased the creatine kinase (CK) levels after 1 and 3 h. Together, these results indicate that HO activity is involved in the edema and myonecrosis caused by *B. jararacussu* venom, and that the inhibition of this activity with ZnDPBG provides some protection against these local effects.

1- INTRODUÇÃO



1.1- Heme-oxigenase

A heme-oxigenase (HO) é uma enzima identificada no final da década de 1960 (Tenhunen *et al.*, 1968, 1969), e que está envolvida na degradação de grupos heme resultando na produção de biliverdina IX, ferro (Fe) e monóxido de carbono (CO), através de uma seqüência de reações envolvendo NADPH: citocromo P-450 redutase e biliverdina redutase. A Figura 1 mostra o mecanismo de ação da HO (Dulak e Józkwicz, 2003; Ryter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007).

A HO cataliza a primeira e principal reação no esquema na Figura 1 que envolve a degradação de heme *b* (Fe-protoporfirina-IX) para formar a biliverdina-IX α (o único isômero da biliverdina produzida por esta via). A reação da HO requer três moléculas de O₂ para cada molécula de heme oxidada e também utiliza equivalentes redutoras oriundas da NADP: citocromo P-450 (citocromo c) redutase (Ortiz de Montellano, 2000; Yoshida e Migita, 2000; Wilks, 2002). A biliverdina-IX α é, por sua vez, convertida em bilirrubina-IX α pela ação de uma redutase NAD(P)H-dependente (biliverdina redutase). Na formação de biliverdina, o CO e Fe são liberados como co-produtos (Ryter *et al.*, 2006), de modo semelhante à liberação de óxido nítrico (NO) durante a metabolização da L-arginina para L-citrulina pela NO sintase (Moncada *et al.*, 1991).

Atualmente, três isoformas de HO são conhecidas: HO-1 (M_r 32 kDa), HO-2 (M_r 34-36 kDa) e HO-3 (M_r 33 kDa) (Otterbein e Choi, 2000; Ryter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007), sendo que as principais são HO-1 e HO-2; a HO-3 tem sido detectada no rim, fígado, baço e cérebro de ratos (McCoubrey *et al.*, 1997), entretanto sua existência tem sido contestada, e sugere-se que a HO-3 representa a expressão de pseudogenes originados de transcritos da HO-2 (Hayashi *et al.*, 2004; Loboda *et al.*, 2008).

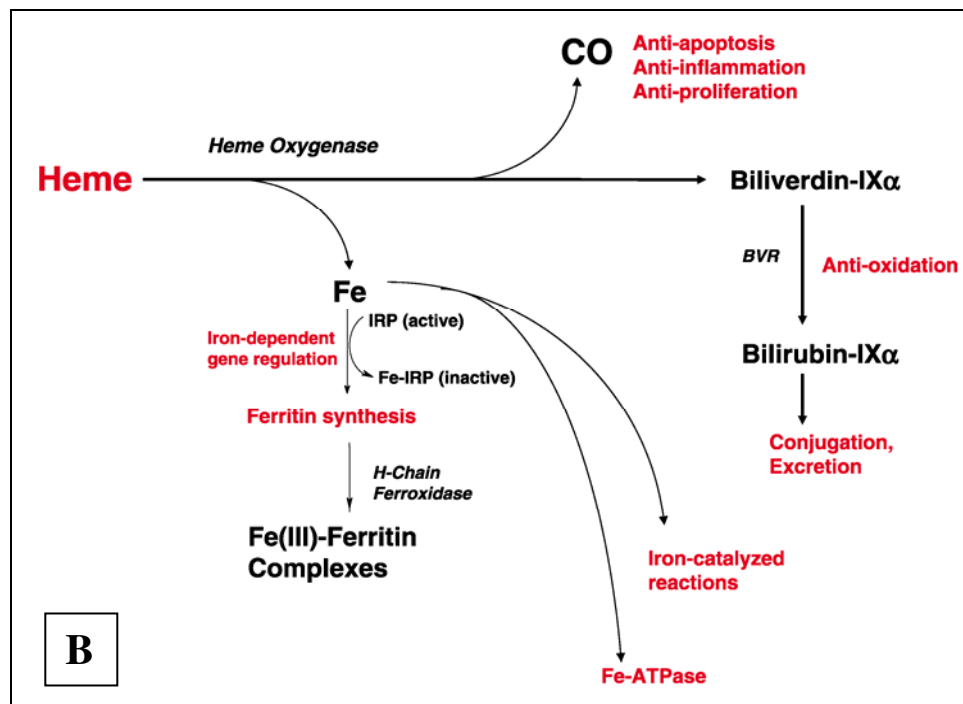
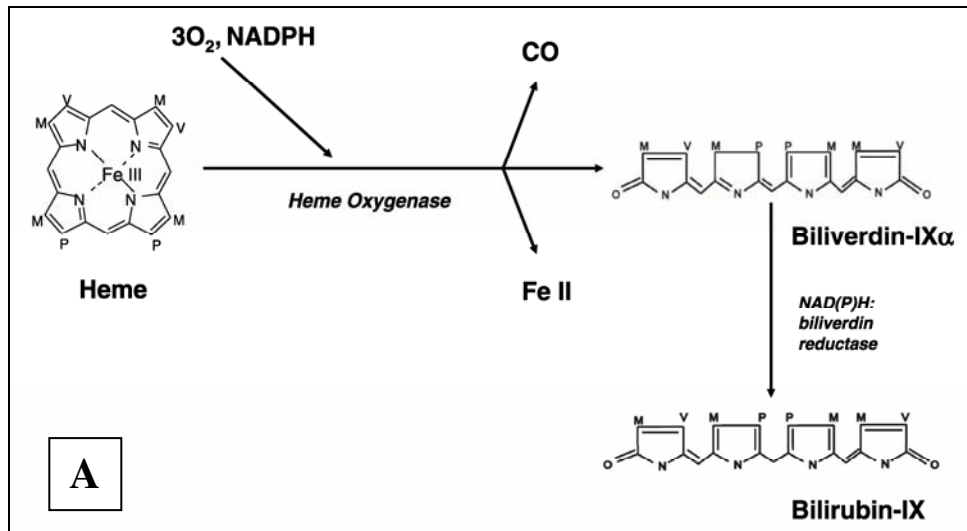


Figura 1- (A) Via de degradação de heme através da ação da HO, mostrando os produtos formados (A, B) e suas ações biológicas (em vermelho) (B). A biliverdina e a bilirrubina podem funcionar como “scavengers” de espécies reativas de oxigênio. BVR = biliverdina redutase, IRP = proteína reguladora de ferro (*iron regulatory protein*) (Fonte: Ryter *et al.*, 2006).

A HO-1 tem ampla distribuição pelo organismo, sendo particularmente abundante no baço e em órgãos relacionados à degradação de hemácias (fígado e medula óssea); também ocorre no endotélio e músculo liso da vasculatura (Ryter *et al.*, 2006) bem como em músculo esquelético (Essig *et al.*, 1997; Vesely *et al.*, 1998; Taillé *et al.*, 2001; Badhwar *et al.*, 2004; Dungey *et al.*, 2006), onde pode ser expressa de forma fibra-dependente (Vesely *et al.*, 1998); neste caso, a HO-1 é expressa predominantemente em músculos que contém uma quantidade alta de fibras vermelhas (tipos I e IIA), uma vez que os níveis de mRNA desta isoforma estão diretamente correlacionado com a quantidade de mioglobina do músculo (Vesely *et al.*, 1999). A HO-1 é induzida por uma grande variedade de estímulos como estresse oxidativo, choque cardíaco, metais pesados, endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, hipóxia, óxido nítrico (NO) e o próprio substrato heme (Shibahara, 1988; Ryter *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Esta isoforma participa na defesa contra o estresse oxidativo e está relacionada aos níveis de glutathione de tal forma que uma diminuição nos níveis da glutathione resulta em uma forte indução de HO-1 e, conseqüentemente proteção celular (Applegate *et al.*, 1991; Lautier *et al.*, 1992; Ewing e Maines, 1993). Além disso, a HO-1 também pode ser induzida por citocinas e outros mediadores durante o processo inflamatório, atenuando assim os danos oxidativos e a apoptose, diminuindo a migração e adesão de leucócitos e a produção de citocinas inflamatórias (Alcaraz *et al.*, 2003). Existem várias condições patológicas nas quais também há uma expressão aumentada de HO-1, como aterosclerose, isquemia do miocárdio, hipertensão, insuficiência renal aguda, hipóxia, anemia ferropriva, e doença de Alzheimer entre outras; nestes casos, acredita-se que a ação da HO-1 é essencialmente citoprotetora (Otterbein e Choi, 2000; Abraham e Kappas, 2008). De fato, atualmente, a HO-1 está sendo intensamente estudada como possível alvo terapêutico em diversas patologias (Ryter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007).

Em condições de hipóxia, a elevação de HO-1 aumenta os níveis de CO, que proporciona aumento no diâmetro do capilar dos vasos, beneficiando o suprimento sanguíneo do tecido exposto ao stress, podendo aumentar o fluxo de células vermelhas. Neste caso, o aumento da atividade de HO-1 pode proporcionar proteção no tecido através da ação vasodilatadora de CO associada aos efeitos antioxidativos da biliverdina (Kubulus *et al.*, 2004).

Ao contrário da HO-1, a HO-2 é constitutiva e é expressa no fígado, músculo esquelético, rim, cérebro, intestino, junção neuromuscular, neurônios, células endoteliais, músculo liso vascular e não vascular (Kusner *et al.*, 1999; Baum *et al.*, 2000; Taillé *et al.*, 2001; Ryter *et al.*, 2006). Nas fibras musculares do músculo esquelético, a HO-2 está presente em células satélites, e em fibroblastos, e, assim como a HO-1, esta isoforma parece estar expressa em maiores quantidades em fibras do tipo I, possivelmente participando na degradação do heme depois de dissociado da mioglobina (função mais específica da HO-1) (Baum *et al.*, 2000). A HO-2 tem um papel importante na regulação do funcionamento do sistema neuronal, modulando a transmissão neuronal no sistema nervoso central, mas também tem funções importantes nos sistemas copulatório, digestivo e cardiovascular (Barañano e Snyder, 2001; Ryter *et al.*, 2006).

Acredita-se que a HO-2 também exerça um papel importante no processo inflamatório, uma vez que a ausência desta isoforma resulta em um influxo contínuo de células inflamatórias e conseqüentemente uma exacerbação da injúria celular. Sendo assim, a função de HO-1 no processo inflamatório pode depender da atividade de HO-2 (Seta *et al.*, 2006). Em nível celular, ambas as isoformas estão associadas ao retículo endoplasmático, ao núcleo, e à membrana plasmática da célula (Figura 2). Neste último caso, há uma co-localização com a proteína caveolina-1 presente nas caveolas na superfície da membrana (Kim *et al.*, 2004).

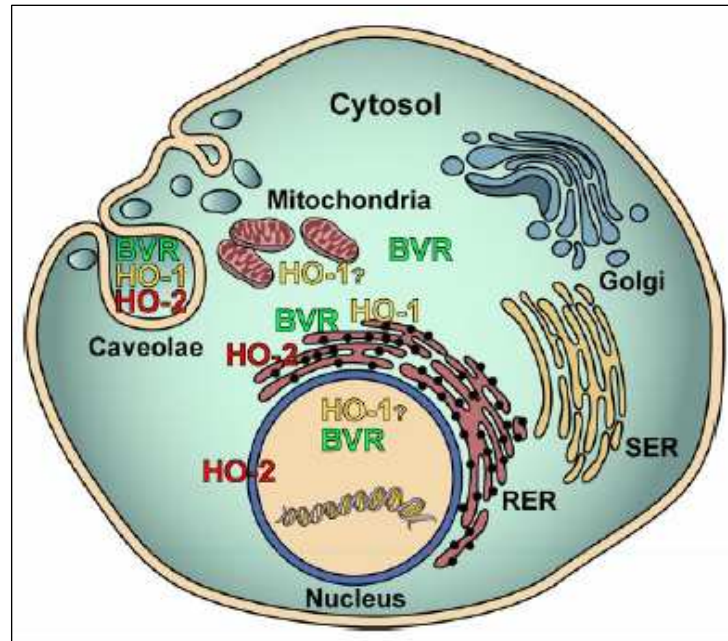


Figura 2- Localização celular da HO-1 e HO-2. BVR = biliverdina redutase, RER = retículo endoplasmático rugoso, SER = retículo endoplasmático liso (Fonte: Ryter *et al.*, 2006).

1.2- Os produtos liberados pela HO

Os produtos liberados pela ação da HO (biliverdina IX, Fe e CO) em baixas concentrações exercem diversos efeitos protetores, inclusive antiapoptóticos, antiinflamatórios, antiproliferativos e antitrombóticos, em contrapartida, em concentrações elevadas, esses produtos possuem efeitos prejudiciais. Em baixas concentrações, a biliverdina e a bilirrubina possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, podendo modular a expressão das selectinas P e E induzidas por LPS no sistema vascular (Vachararajani *et al.*, 2000). Além disso, a biliverdina e bilirrubina também podem remover radicais peroxil (função de “scavenger”), inibir a peroxidação lipídica (Barañano *et al.*, 2002), a adesão de neutrófilos e a atividade da NADPH oxidase (Abraham e Kappas, 2008). Já em concentrações elevadas, é potencialmente tóxica,

levando a hiperbilirrubinemia, ocasionando icterícia (principalmente em recém nascidos) e comprometimentos neurológicos (Scott *et al.*, 2007).

O ferro liberado do heme estimula a síntese de ferritina que possui atividades antioxidantes e antiinflamatórias (Balla *et al.*, 1992). Esse mecanismo é essencial, pois o ferro na sua forma livre é altamente tóxico podendo levar a formação de espécies reativas de oxigênio resultando em danos a vários componentes celulares (Abraham e Kappas, 2008).

O CO endógeno pode ter origens heme (86%, de hemácias e hemeproteínas) e não-heme (14%, de fotooxidação, peroxidação lipídica e xenobióticos) (Vreman *et al.*, 2002; Abraham e Kappas, 2008) e, em baixas concentrações (< 250 p.p.m.) exerce diversos efeitos benéficos ao organismo (Ryter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007). Conforme indicado na Figura 3, esses efeitos protetores são mediados principalmente (1) pela ativação da guanilato ciclase solúvel, levando à formação de GMPc, que exerce várias ações vasculares, inclusive a regulação do tônus vascular e (2) pela modulação das vias de quinases ativadas por mitógenos, podendo inibir a formação de mediadores inflamatórios como citocinas (Brouard *et al.*, 2000; Otterbein *et al.*, 2000; Ryter *et al.*, 2006). Além da sua capacidade de modular a proliferação celular, o relaxamento vascular, o processo inflamatório, e as vias MAP-kinases, o CO também ativa canais de K⁺ (promovendo relaxamento dos vasos) e modula a expressão do fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), que estimula a angiogênese (Dulak e Józkwicz, 2003; Loboda *et al.*, 2008).

A Figura 4 também mostra as ações protetoras do CO e dos pigmentos da bile, biliverdina e bilirrubina, em diferentes tipos de células e as patologias que são beneficiadas com a presença destas substâncias.

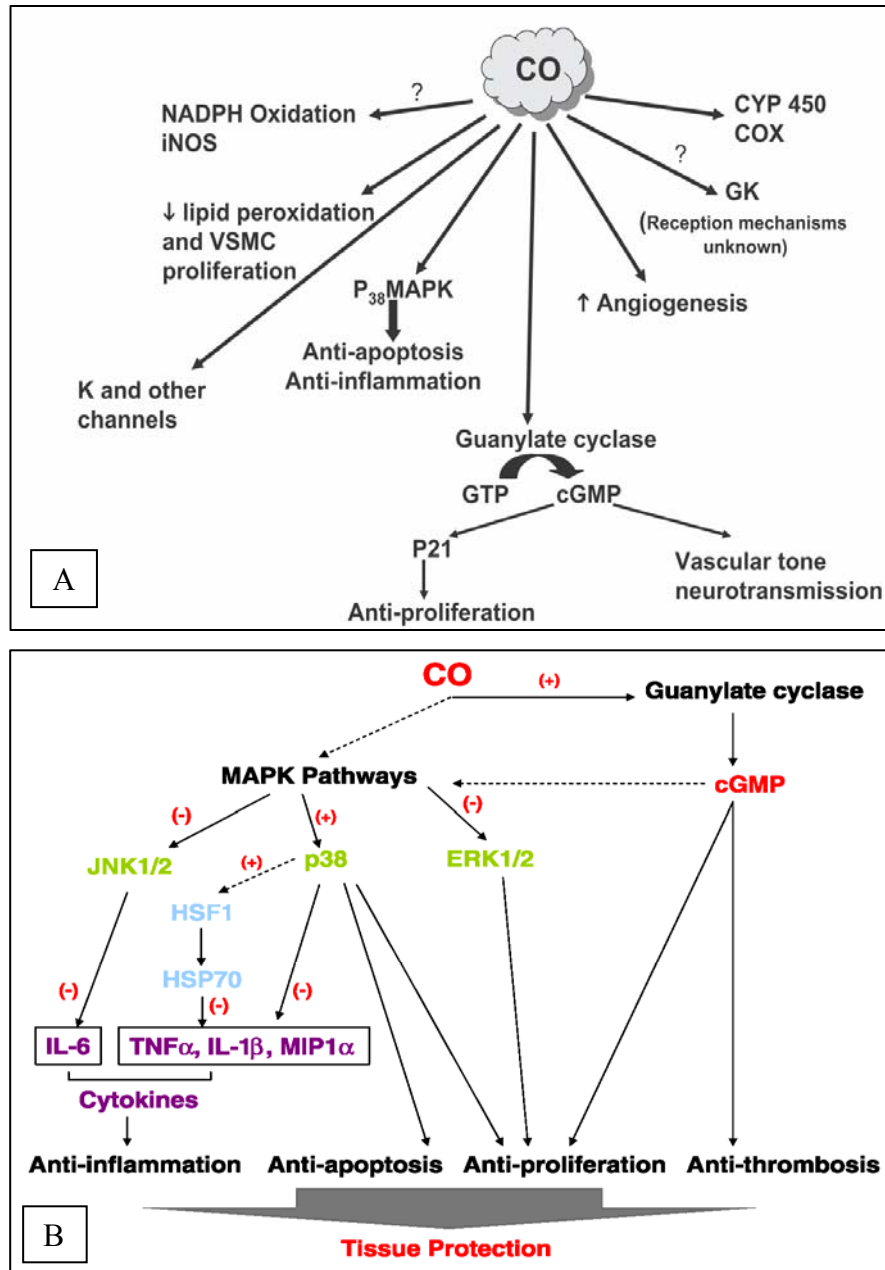


Figura 3- Ações protetoras do CO derivado da degradação do heme (Fontes: **A** - Abraham e Kappas, 2008; **B** - Ryter *et al.*, 2006). COX: ciclooxygenase, CYP 450: citocromo P450, VSMC: célula de músculo vascular liso, (+): estimulação, (-): inibição.

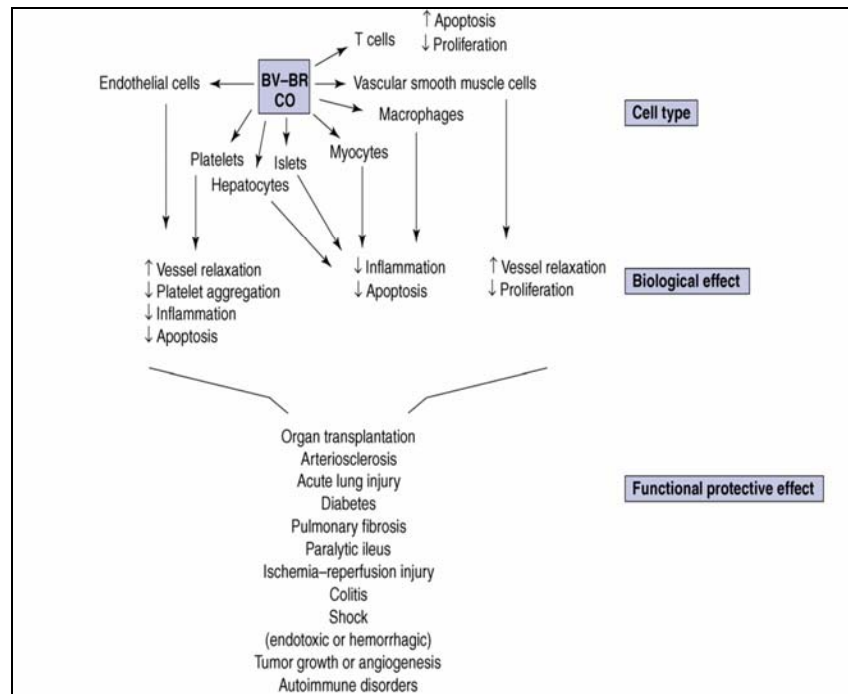


Figura 4- Ações protetoras do CO e dos pigmentos da bile (biliverdina e bilirrubina).
BR = bilirrubina, BV = biliverdina redutase. (Fonte: Scott *et al.*, 2007).

No entanto, concentrações elevadas nos níveis de CO podem estimular a geração de radicais livres em mitocôndrias (Zhang *et al.*, 2002) e levar à formação de carboxihemoglobina, reduzindo o transporte de O₂ para os tecidos, resultando assim em hipóxia ou anóxia (Kourembanas, 2002; Scott *et al.*, 2007; Piantadosi *et al.*, 2008) como demonstra a figura 5. Algumas hemoproteínas como mioglobina, catalase, citocromo P 450 podem ser influenciadas pela ação do monóxido de carbono que inibe a atividade catalítica desses componentes, resultando em um estresse oxidativo no endotélio e em outros tipos de células (Piantadosi, 2002). O CO também pode induzir a geração de peróxido de hidrogênio através da estimulação da expressão de manganês superóxido dismutase (MnSOD) (Dulak e Józkwicz, 2003).

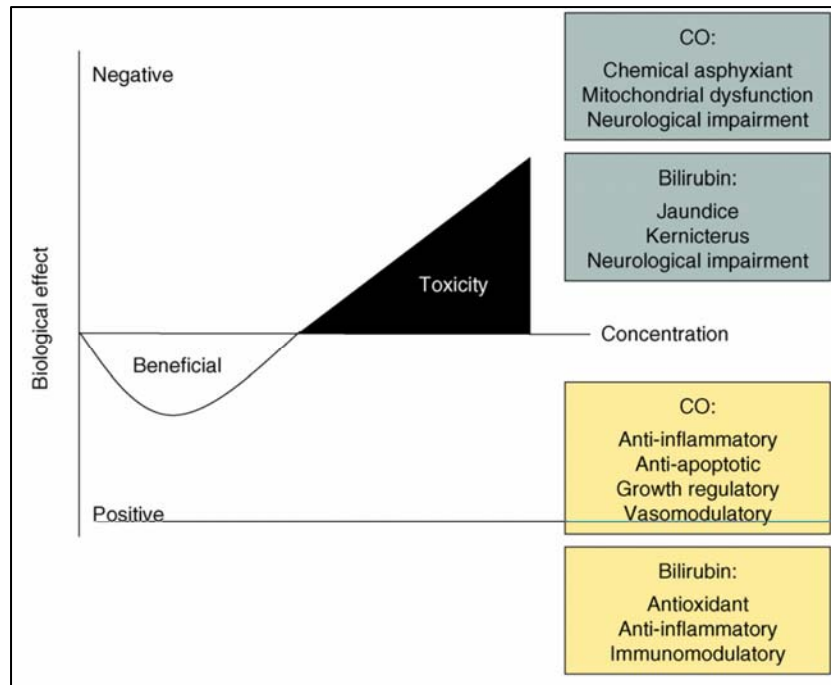


Figura 5- Efeitos benéficos e tóxicos do CO e da bilirrubina de acordo com a concentração (Fonte: Scott *et al.*, 2007).

O CO partilha muitas propriedades fisiológicas com o óxido nítrico (NO) (Poulos, 2005). Estão envolvidos na modulação e transmissão neuronal, no controle do tônus vascular e na inibição da agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 1991; Ryter *et al.*, 2006). Tanto o CO como o NO são vasodilatadores, sendo este efeito mediado pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), aumentando cGMP, um segundo mensageiro envolvido na regulação de funções celulares e do tônus vascular (Kubulus *et al.*, 2004). A ativação da GCs pelo CO é mais fraca (30 a 100 vezes) que a do NO e o CO pode competir com o NO na ativação da GCs em situações que o NO é o regulador dominante (Ryter *et al.*, 2004). O NO e o CO também promovem relaxamento dos vasos através de canais de K, sendo que o CO atua na subunidade α e o NO na subunidade β (Abraham e Kappas, 2008). Assim como o NO, o CO inibe a agregação plaquetária através da ativação da GCs e geração de GMPc, diminuindo a concentração de cálcio intraplaquetário (Morse e Choi, 2002).

A combinação de concentrações elevadas de monóxido de carbono e óxido nítrico pode provocar disfunções mitocondriais levando a formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente a peroxidação lipídica (Dulak e Józkowicz, 2003).

1.3- Dano local causado por peçonhas botrópicas

O envenenamento botrópico resulta em ações locais e sistêmicas. As ações locais incluem dor, edema, hemorragia e necrose (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Teixeira *et al.*, 2003), enquanto as ações sistêmicas consistem, principalmente, em distúrbios de coagulação, hemorragia interna (que leva à hipovolemia e choque) e insuficiência renal aguda (IRA) (Rosenfeld, 1971; Fan e Cardoso, 1995; Russell *et al.*, 1997; França e Málaque, 2003). Tanto os efeitos locais como os sistêmicos resultam da ação concomitante de fosfolipases A₂ (PLA₂) (Gutiérrez e Lomonte, 1995, 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003), metaloproteinases (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005) e outras enzimas hidrolíticas presentes nestas peçonhas (Aird, 2002), as quais induzem a liberação de uma variedade de mediadores endógenos (peptídeos como a bradicinina, aminas biogênicas como a histamina e serotonina, e metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos).

1.3.1- Hemorragia e hemorraginas

A hemorragia local é uma das manifestações mais freqüentes do envenenamento botrópico e é mediado por metaloproteinases hemorrágicas ou hemorraginas (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005). As metaloproteinases são enzimas dependentes de zinco, com massa molecular variando de 15 a 100 kDa, sendo classificadas atualmente em quatro grupos principais, com vários subgrupos (Fox e Serrano, 2005). Além de serem responsáveis pela hemorragia, também estão envolvidas em alterações patológicas como mionecrose local, danos na pele, edema e outras reações associadas com a inflamação (Gutiérrez e Rucavado 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005).

As metaloproteinases exercem seu efeito hemorrágico principalmente através de sua ação proteolítica, rompendo a integridade da parede vascular através da degradação dos componentes protéicos da membrana basal, como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (Baramova *et al.*, 1991; Maryuama *et al.*, 1992; Rucavado *et al.*, 1995; Gutiérrez e Rucavado, 2000). Esta ação ocorre principalmente na microvasculatura (capilares e vênulas pós-capilares), geralmente sem envolvimento de vasos de maior calibre (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005).

A hemorragia induzida por metaloproteinases pode ocorrer através de dois mecanismos, sendo estes denominados *per rexis* caracterizado por alterações drásticas nas células endoteliais, com formação de fendas (*gaps*) por onde ocorre o extravasamento de hemácias, ou por *diapedese*, que é a saída dos eritrócitos através das junções intercelulares dilatadas (Gutiérrez *et al.*, 2005).

1.3.2- Edema

A atividade edematizante das peçonhas é muito potente, podendo induzir um aumento significativo do peso ou no volume do membro afetado (Trebien *et al.*, 1989; Tan *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1993; Chaves *et al.*, 1995). O edema pode alcançar seu pico de 15 min a 30 min após inoculação da peçonha (Trebien *et al.*, 1989; Lomonte *et al.*, 1993; Soares de Moura *et al.*, 1998).

Ao aumento da permeabilidade microvascular causado pela peçonha, pode-se agregar o extravasamento de sangue devido à ação destruidora das hemorraginas sobre a microvasculatura (*vide supra*). Esta combinação de edema e hemorragia é dependente da dose injetada, sendo que doses baixas de peçonha induzem edema sem hemorragia enquanto doses maiores produzem ambos os efeitos (Lomonte *et al.*, 2003).

Os componentes responsáveis pela ação edematogênica das peçonhas são de natureza bioquímica muito variada e incluem aminas biogênicas (especialmente histamina e serotonina) peptídeos e proteínas como a fosfolipase A₂ (PLA₂), esterases, proteases, enzimas liberadoras de cininas e lectinas (Lomonte *et al.*, 1990; Landucci *et al.*, 2000).

A ação fosfolipásica é importante na formação de edema (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Lomonte *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). Embora a atividade catalítica da PLA₂ contribui para a formação do edema, esta atividade não é considerada essencial para que isso ocorra (Díaz *et al.*, 1992; Landucci *et al.*, 2000; Kanashiro *et al.*, 2002).

1.3.3- Mionecrose e miotoxinas

A mionecrose é um fenômeno bastante comum no envenenamento botrópico. Pode ocorrer concomitantemente com a hemorragia, porém se estende por uma escala de tempo maior, sendo responsável pelo dano extenso observado em casos clínicos, e freqüentemente resulta em seqüelas permanentes, podendo implicar na perda de função permanente ou até mesmo na amputação do membro (França e Málaque, 2003).

A mionecrose induzida por peçonhas botrópicas tem dois mecanismos fundamentais: 1) uma ação direta de miotoxinas sobre as células musculares, originando lesão celular irreversível (Gutiérrez e Ownby, 2003), e 2) isquemia desencadeada no tecido muscular como conseqüência do sangramento (devido a lesões na parede vascular), distúrbios de coagulação, reações inflamatórias, e síndrome compartimental (levando à compressão tissular) (Rosenfeld, 1971; Watt, 1989; Fan e Cardoso, 1995; Russell *et al.*, 1997; França e Málaque, 2003).

As miotoxinas botrópicas são geralmente básicas, com massa molecular de ~15 kDa e têm estrutura fosfolipásica, podendo possuir ou não alta atividade enzimática (miotoxinas PLA₂ do tipo Asp49 e Lys49, respectivamente) (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003). Estas toxinas atuam principalmente na membrana plasmática, onde causam lesões “delta”, o que leva as alterações intracelulares tais como hipercontração dos miofilamentos musculares e alterações mitocondriais (ruptura das membranas e formação de densidades floculentas). Os núcleos têm aspecto picnótico e as membranas intracelulares (retículo sarcoplasmático e túbulos T) formam múltiplas vesículas no citosol. Após algumas horas, ocorre também infiltrado de células inflamatórias (podendo alcançar seu pico entre 6 e 72 horas) composto de leucócitos

polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) e macrófagos (Gutiérrez *et al.*, 1984a, 1989, 1990, 1991), que são responsáveis pela remoção do tecido necrótico. Boa parte dos efeitos intracelulares das PLA₂ miotóxicas é devido à uma desregulação do fluxo iônico nas células, principalmente de cálcio (Brusés *et al.*, 1993; Gutiérrez e Lomonte, 1995), cujo aumento intracelular pode levar à ativação de proteases dependentes de cálcio e PLA₂ intracelulares. A ativação de proteases citosólicas é responsável pela degradação e perda de diversas proteínas musculares estruturais, promovendo a desestabilização do aparelho contráctil e perda das linhas Z, e das bandas A e I (Gutiérrez *et al.*, 1984a, 1990; Harris e Cullen, 1990; Harris, 2003).

1.3.4- Regeneração muscular

A lesão muscular induzida por hemorraginas e miotoxinas é frequentemente seguida por uma regeneração tecidual que pode levar dias a semanas para se completar (Gutiérrez e Ownby, 2003; Harris, 2003). A ativação de células satélites, definida como células miogênicas localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal de fibras musculares adultas (Allbrook, 1981; Grounds, 1991; Harris, 2003, Gutiérrez e Rucavado, 2000), é fundamental para o processo de regeneração muscular (Harris *et al.*, 2003; Santo Neto *et al.*, 2006). Durante o processo degenerativo, essas células são ativadas, se proliferam e diferenciam em mioblastos, os quais se fundem em miotubos para formar novas fibras musculares multinucleadas (Chargé e Rudnicki, 2004; Tidball, 2005).

Após a necrose muscular induzida pela injeção de frações miotóxicas de peçonhas botrópicas, há progressiva regeneração muscular, com abundantes células que apresentam núcleos centralizados, aspecto típico de células musculares regenerativas (Gutiérrez *et al.*, 1984b, 1989, 1991; Ulman e Oldfors 1991). No entanto, quando se utiliza peçonhas brutas a regeneração muscular é apenas parcial e incompleta, observando-se o aparecimento de fibrose e células regenerativas de tamanho reduzido (Queiróz *et al.*, 1984; Arce *et al.*, 1991, Gutiérrez *et al.*, 1995), isso porque, a peçonha bruta, mediante suas hemorraginas, leva à necrose dos vasos da microcirculação, impedindo a adequada regeneração muscular devido à isquemia (Gutiérrez e Lomonte, 1995, 2003).

Apesar das células satélites apresentarem-se resistentes a ação da fosfolipase A₂ presente em peçonhas (Harris, 2003), sua ativação depende de vários fatores miogênicos que podem ser secretados pelos macrófagos (que são dependentes da presença de neutrófilos) (Cantini *et al.*, 2002), portanto, para o recrutamento dessas células inflamatórias é necessária a preservação da microcirculação local. Acredita-se que a preservação do leito vascular, dos fascículos nervosos motores e da membrana basal dos miócitos, no caso da lesão produzida pelas miotoxinas purificadas, torne possível a completa regeneração muscular (Allbrook, 1981; Grounds, 1991).

A administração de L-arginina (precursor do NO) auxilia o processo de regeneração muscular depois do envenenamento por *Bothrops jararacussu* por estimular a ativação de células satélites mesmo na ausência da microcirculação local. Este fato sugere que ativadores farmacológicos do NO poderão ser utilizados no tratamento da perda de massa muscular causada pelo envenenamento por esta serpente (Santo Neto *et al.*, 2006).

1.4- *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu* é encontrada no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (Campbell e Lamar, 2004) e é conhecida pela elevada quantidade de peçonha que produz (Rosenfeld, 1971). A peçonha de *B. jararacussu* tem alta atividade hemorrágica e miotóxica (Ferreira *et al.*, 1992), causando mionecrose (Queiróz *et al.*, 1984) e liberação de creatinoquinase (Gutiérrez *et al.*, 1991), efeitos estes que também são vistos em humanos envenenados por esta espécie (Milani *et al.*, 1997). Em animais experimentais, a regeneração muscular após a inoculação desta peçonha é incompleta, com evidente perda de função e de massa muscular, advindo possivelmente do extenso dano vascular causado (Queiróz *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1991; Santo Neto e Marques, 2005), porém a causa desta deficiência na regeneração ainda não foi esclarecida (Santo Neto *et al.*, 2004). A mionecrose causada por *B. jararacussu* está relacionada à ação de duas miotoxinas principalmente, a bothropstoxin-I (Lys49) (Cintra *et al.*, 1993) e a bothropstoxin-II (Asp49) (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988). Ambas possuem estrutura PLA₂, sendo que a primeira é desprovida de atividade fosfolipásica (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995) e a segunda apresenta

uma baixa atividade (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988). Além destas, não se pode descartar a ação concomitante de metaloproteinases (Mazzi *et al.*, 2004) e outros componentes da peçonha, tanto na ação necrótica quanto na regeneração muscular incompleta.

O papel modulador da HO neste dano ainda não foi investigado. Considerando que a heme-oxigenase é uma enzima envolvida na degradação de grupos heme, levando à formação de biliverdina IX, ferro e monóxido de carbono (CO) e que, em baixas concentrações, esses produtos exercem diversos efeitos protetores, enquanto, em concentrações elevadas, podem resultar em efeitos prejudiciais, o estudo da participação desta enzima nos efeitos locais da peçonha de *B. jararacussu* é relevante para o melhor entendimento das ações desta peçonha.

2- OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivos:

1. Investigar o envolvimento da HO na permeabilidade vascular, na hemorragia e na mionecrose causadas pela peçonha de *B. jararacussu*.
2. Investigar a influência da inibição da HO sobre as alterações bioquímicas e morfológicas causadas pela peçonha *B. jararacussu*.

3- MATERIAIS

3.1- Reagentes e peçonha

Os reagentes para os ensaios bioquímicos, expressão, biológicos e a análise histológica foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA), Calbiochem (La Jolla, CA, EUA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Leica (Nussloch, Alemanha) e fornecedores locais. O inibidor não-seletivo da HO, zinco deuteroporfirina 2,4-bis-glicol (ZnDPBG), foi obtido da Frontier Scientific – Porphyrin Products (Logan, UT, EUA).

A peçonha liofilizada de *B. jararacussu*, extraída de exemplares adultos de ambos os sexos, foi obtida do Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA, Morungaba, SP) e estocada a -20°C (lotes 04/06 e 06/06).

3.2- Animais

Camundongos machos Swiss (18-30 g) obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP) foram mantidos à 22°C em gaiolas plásticas (5/gaiola) sob ciclo de luz/escuro de 12 h com acesso livre à água e ração (Nuvital®). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolo nº 1050-1), e realizados de acordo com as recomendações éticas gerais do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

4- MÉTODOS



4.1- Permeabilidade vascular

Camundongos foram anestesiados com uretano (2,3 g/kg, i.p.) e, uma vez atingido um nível de anestesia adequado (determinado pela perda de reflexos pedal e córneo) receberam ^{125}I -albumina humana (1,5 uCi, i.v., via uma veia caudal) diluída em NaCl 0,9%. Em seguida, a superfície dorsal foi depilada e diferentes quantidades de peçonha (dissolvida em Tyrode) ou solução Tyrode nos sítios controles foram injetadas (volume fixo de 50 μL /sítio) usando um esquema de seleção aleatória para os sítios de injeção. Trinta minutos após a injeção da peçonha ou solução Tyrode, 0,5 mL de sangue foram coletados e centrifugados em 10,000 x g durante 4 min para separação do plasma. Em seguida, uma alíquota de 100 μL foi removida para a determinação da quantidade de albumina circulante. Após o sacrifício dos camundongos por deslocamento cervical, os sítios de pele injetados com peçonha ou solução Tyrode foram recortados, pesados e os níveis de radioatividade determinados num contador de radiação gama. A quantidade de extravasamento protéico foi expresso em microlitros (μL) de plasma extravasado baseado na radioatividade detectada na amostra de sangue. A formação do edema foi avaliada pela quantidade extravascular de ^{125}I -albumina presente na pele comparada com a do plasma (Cao *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2006a,b).

4.2- Atividade hemorrágica

Camundongos foram anestesiados levemente com halotano e a superfície dorsal foi depilada. Em seguida, quantidades variadas de peçonha diluída em NaCl 0,9% (ou somente salina, sem peçonha, nos controles) foram injetadas intradermicamente (i.d.) (volume fixo de 50 μL /sítio). Após 2 h, os camundongos foram mortos com overdose de anestésico (halotano), a pele do dorso foi removida e o diâmetro do halo hemorrágico na face interna da pele foi medido (em mm). A dose hemorrágica mínima (DHM) foi definida como a menor quantidade de peçonha (μg) capaz de produzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (baseado na média de dois diâmetros perpendiculares) (Theakston e Reid, 1983; Ferreira *et al.*, 1992).

4.3- Mionecrose

A peçonha de *B. jararacussu* foi injetada no músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos nas doses de 25 µg e 75 µg (50 µL), seguido por sacrifício 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h e 7, 14, 21 e 28 dias após a injeção. O músculo contralateral (direito: não injetado) também foi analisado. Os camundongos controles receberam o mesmo volume de salina tamponado com fosfato 50 mM (PBS) ao invés de peçonha. A dose de 75 µg, nos intervalos 1, 3, 6, 12 e 24 h foi avaliada na presença do inibidor da HO. Após o sacrifício com overdose de anestésico (halotano), os músculos foram dissecados e processados para determinação da atividade enzimática ou histológica. O músculo dissecado para a atividade enzimática foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer a -80°C. Para a análise histológica, o músculo dissecado foi colocado imediatamente em fixador (paraformaldeído 4%) e processado conforme descrito abaixo.

4.3.1- Creatinoquinase (CK)

Os níveis de CK plasmáticos foram determinados em amostras de sangue coletadas nos intervalos de sacrifício dos camundongos indicados acima. O sangue foi coletado pela veia caudal em tubos capilares heparinizados e centrifugados durante 5 min. A atividade de CK foi determinada a partir de kits comerciais (Bioclim, Belo Horizonte, MG, Brasil). A leitura foi feita em um leitor microplacas SpectraMax 340 no comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em unidades de CK por litro (U/L), em que uma unidade corresponde à fosforilação de 1 nmol de creatina por minuto, a 37 ° C.

4.3.2- Atividade HO

A atividade da HO (atividade total) em homogenatos de músculo foi determinada pela formação de bilirrubina. Os músculos foram homogenizados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, 0,15M NaCl (KPBS) e centrifugados a 18,000 x g por 15 min. O sobrenadante foi usado para correr o ensaio. A solução da reação continha (volume final de 500 µL) 0,1 M de KPBS pH 7,4, 350 µg de proteína do músculo, 25 µM de hemin, 1,5 mg de citosol de fígado de rato/ml (fonte de biliverdina redutase) e 0,4 mM

de NADPH (para iniciar a reação) (igual volume de KPBS foi adicionado ao branco no lugar de NADPH). As amostras foram colocadas em um banho sob agitação à 37°C, protegidas da luz, durante 30 minutos. A reação foi interrompida colocando as amostras no gelo. A quantidade de bilirrubina produzida foi avaliada em 464 nm em um espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 800) usando um coeficiente de extinção molar de $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. A atividade foi expressa em picomoles de bilirrubina formada por miligrama de proteína por hora (Foresti *et al.*, 1999; Badhwar *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004).

Diluição do hemin: A solução de hemin 250 μM foi preparada imediatamente antes de ser usada (protegida da luz), sendo diluída em solução de NaOH 0,02 M (dissolvida em vórtex): KPBS 0,1 M pH 7,4 (1:10, v/v, respectivamente) (Yet *et al.*, 2002).

Obtenção da biliverdina redutase: O fígado de rato foi perfundido com tampão KPBS 0,1 M pH 7,4 e aproximadamente 8 g deste tecido foi transferido para um tubo contendo 16 ml de tampão Tris-HCl pH 7,2, NaCl 0,15 M, DTT 1 mM e EDTA 1 mM. O material foi homogenizado e centrifugado a $10,000 \times g$ à 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi filtrado e centrifugado novamente, sendo depois coletado e então centrifugado em $105,000 \times g$ à 4°C durante 1 h. O sobrenadante (citosol) foi então usado como fonte de biliverdina redutase (Yet *et al.*, 2002). Esse procedimento foi realizado a cada ensaio enzimático, visto que a biliverdina redutase perde a sua atividade depois de congelada.

As condições ideais para o ensaio da atividade da HO (descrito acima) foram padronizadas em experimentos preliminares. A atividade observada foi linear até uma concentração de 500 μg de proteína de extrato de músculo gastrocnêmio. Para os ensaios rotineiros, foi usada a concentração de extrato de 350 $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi escolhida para permitir eventuais reduções na atividade após tratamento dos músculos com peçonha. Também foi avaliada a quantidade de citosol hepático como fonte de biliverdina redutase, havendo uma relação linear entre a atividade da HO e a quantidade de citosol usada. Para os ensaios rotineiros, foi escolhida a concentração de 1,5 mg de proteína citosólica/mL (faixa semelhante a outros estudos da literatura). Finalmente, foi avaliada a influência do tempo de incubação. O intervalo ideal foi de 30 min já que depois deste tempo houve ligeira redução na atividade observada.

4.3.3- Avaliação da expressão gênica da HO-1 e HO-2: PCR em tempo real

Reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método de amplificação (criação de múltiplas cópias) de DNA (ácido desoxirribonucléico). O PCR em tempo real consiste em detectar e quantificar a amplificação de DNA, sem a necessidade de realizar purificação e análises adicionais.

Extração de RNA

Para obtenção do RNA do músculo gastrocnêmio de camundongos injetado com 75 µg da peçonha de *B. jararacussu* foi utilizado o método de extração com o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen).

Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita através de PCR para amplificação do gene GAPDH. As reações continham: 5,0 µL de 10x PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µL de 50 mM MgCl₂, 1,0 µL de 10 mM dNTPs, 1,0 µL de 10 mM de primer GAPDH-F, 1,0 µL de 10 mM de primer GAPDH-R, 1,0 µL de *Taq* DNA polimerase, 1,0 µL de cDNA e 39,5 µL de água, para um volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos: 94°C/30 seg, 58°C/45 seg e 72°C/40 seg, sendo finalizado por 72°C/7 min. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da qualidade do cDNA.

Desenho dos primers

Os primers utilizados nas reações foram desenhados através de consulta do site www.invitrogen.com e uso do software “Primer Express” (Applied Biosystems), e analisados no programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e dímeros. Os primers utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

Tabela 1- Sequências dos primers utilizados na amplificação dos genes estudados através de PCR quantitativo em tempo real. HMOX-1, HMOX-2: genes da HO-1 e HO-2. F- frente, R- reverso.

Gene	Sequência do primer
	5'→3'
HMOX-1	CAGGTGTCCAGAGAAGGCTTT
(F)HMOX-1 (R)	GTGGGGCATAGACTGGGTTC
HMOX-2 (F)	ATGCCTTGGACCTGAATTTG
HMOX-2 (R)	CTAGCATGGAGCCAGCCTG
GAPDH (F)	TGCACCACCAACTGCTTA
GAPDH (R)	GGATGCAGGGATGATGTTC
β-actina (F)	CCTGCCAAGTATGATGACATCAA
β-actina (R)	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

PCR quantitativo em tempo teal

A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou uma molécula intercalante de DNA na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBRGreen PCR Master Mix® (Invitrogen) que, além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTPs, MgCl₂, tampão, *Taq* Ampli-Gold), contém o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O ciclo no

qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto maior o número de cópias no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct. As reações continham 6 µL do reagente SYBRGreen PCR Master Mix®, 5 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de *primer* determinada :300 nM (HMOX-1 e HMOX-2) e 150 nM (β actina e GAPDH), perfazendo um volume final de 12 µL. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/1 min. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de *melting temperature* (TM) entre os produtos de PCR amplificados; essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

Análise dos dados do PCR em tempo real

A expressão dos genes de interesse foi determinada de uma forma relativa, sendo normalizados com relação a genes chamados calibradores; neste estudo foram utilizados a β-actina e o GAPDH, que são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação em diversas condições. No entanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que a expressão desses genes pode variar consideravelmente (Vandesompele, 2002).

Dos valores de Ct obtidos, foi calculada a média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\Delta Ct}$, onde E = eficiência da reação e o $\Delta Ct =$ menor Ct observado – Ct da amostra. Desta forma, a expressão foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (menor Ct observado), que recebeu valor $Q = 1$. Os valores de Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao programa *Gnorm* (Vandesompele, 2002), que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado *fator de normalização da amostra*. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e o fator de normalização da amostra. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de expressão.

4.3.4- Análise histológica

O tecido muscular foi fixado em paraformaldeído 4% (preparado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) durante 12 h e processado para microscopia de luz. Para desidratação dos fragmentos do tecido, foram utilizados gradientes crescentes de álcoois (etanol), seguido de diafanização em xilol, embebição e inclusão em parafina (Histosec-Merck). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas usando um micrótomo (Leica RM 2245, Alemanha), e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e vermelho de picrosirius para posterior análise das alterações histológicas (Boer-Lima *et al.*, 1999, 2002). As lâminas foram examinadas em microscópio Leica DM 5000B e as imagens foram captadas, processadas e analisadas usando uma câmara CCD LEICA CTR 5000 e softwares de processamento e análises de imagem LEICA Q Win Plus v.3.2.0.

Foi realizado uma análise histológica quantitativa no tecido muscular injetado com peçonha (75 µg) e nos injetados com peçonha (75 µg) + ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.) nos intervalos de 1, 3 e 6 h após o envenenamento. Para cada animal, foram analisadas duas lâminas (cortes não sucessivos) coradas com hematoxilina e eosina. Cada uma dessas lâminas continha três cortes consecutivos de tecido muscular, sendo analisados nove campos escolhidos aleatoriamente, totalizando dezoito campos na soma das duas lâminas. Nos cortes longitudinais, mediu-se a área de extensão de hemorragia comparada a área total de cada campo e o valor expresso em porcentagem. Já nos cortes transversais, contou-se o número de células lesadas em relação ao número total de células por campo, e o valor expresso em porcentagem.

4.4- Tratamento com inibidor

O envolvimento da HO nas alterações de permeabilidade vascular, hemorragia e mionecrose produzidas pela peçonha de *B. jararacussu* foi avaliado usando o inibidor não-seletivo para as isoformas da HO: zinco deuteroporfirina 2,4-bis-glicol (ZnDPBG) co-injetado com a peçonha (25, 50, 100 e 200 nmol/sítio, nos experimentos de edema) ou administrado 30 min antes (45 ou 90 µmol/kg, i.p., nos experimentos de edema e

hemorragia) (Johnson *et al.*, 1995). Na mionecrose, o ZnDPBG na dose de 90 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. foi administrado 15 min após a injeção da peçonha. O ZnDPBG foi preparado em uma solução de 50 mmol de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{L}$ imediatamente antes de ser usado e protegido da luz, sendo administrado em um volume de 10 mL/kg, i.p. (Teran *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005). Este inibidor inibe a HO sem inibir a NO sintase (Appleton *et al.*, 1999).

Nos experimentos de edema e hemorragia, o envolvimento do NO também foi avaliado através da administração do N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor não-seletivo da NO sintase. Nos experimentos de edema, o L-NAME (50, 100, 200 e 300 nmol/sítio) foi co-injetado com a peçonha e nos experimentos de hemorragia, administrado 30 min antes na dose de 50 mg/kg, i.p.

4.5- Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram feitas usando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett ou de Bonferroni, através do software Prism v. 4 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

5- RESULTADOS

5.1- Permeabilidade vascular (edema)

A Figura 1A mostra que a peçonha de *B. jararacussu* aumentou a permeabilidade vascular de forma dose-dependente. Baseado nestes resultados, a dose de 1µg/sítio foi escolhida para subseqüentes experimentos por aumentar bem a permeabilidade vascular com hemorragia abaixo da DMH.

O painel B da Figura 1 mostra que a co-injeção intradérmica (i.d.) do inibidor da HO, ZnDPBG (até 200 nmol/sítio), não alterou significativamente o aumento de permeabilidade causado pela peçonha. Porém, quando administrado pela via i.p., o inibidor (45 ou 90 µmol/kg) inibiu de forma dose-dependente (52% e 74%, respectivamente) o aumento da permeabilidade vascular (Fig. 1C). Note que neste caso, o próprio ZnDPBG, quando dado sozinho i.p., reduz a permeabilidade vascular, sugerindo um papel para HO no controle deste fenômeno (provavelmente através de vasoconstrição) em situações basais. Ao contrário do ZnDPBG, o inibidor da NOS, o L-NAME, inibiu significativamente ($p<0,05$) o aumento da permeabilidade vascular em 46,4±0,7%, 56±5,8%, 79,4±3,2% e 73,4±3% (n=6 cada) quando co-injetado i.d. com a peçonha (1 µg/sítio) nas doses de 50, 100, 200 e 300 nmol/sítio, respectivamente (Fig. 1D). [Considerando a resposta positiva obtida com a injeção i.d. do L-NAME, não foi avaliada a influência da administração i.p. deste inibidor sobre a permeabilidade vascular].

Tendo em vista a capacidade do ZnDPBG e do L-NAME de inibir o aumento de permeabilidade vascular causado pela peçonha de *B. jararacussu*, investigamos o efeito da co-administração destes dois inibidores. A Figura 2A,B mostra que a inibição na presença do ZnDPBG (45 µmol/kg, i.p.) + L-NAME (100 nmol/sítio) e ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.) + L-NAME (100 nmol/sítio) foi semelhante àquela observada na presença do ZnDPBG sozinho em cada uma das doses (46,5% e 65,8%, respectivamente). Porém, quando a dose do L-NAME foi aumentada para 200 nmol/sítio na presença de ZnDPBG (45 µmol/kg, i.p.), houve inibição completa do aumento de permeabilidade (Fig. 2C).

5.2- Atividade hemorrágica

A Figura 3A mostra a hemorragia frente a várias doses de peçonha. Baseado nesta curva dose-resposta, foi escolhido a dose de 3 e 10 $\mu\text{g/sítio}$ para testes subseqüentes, pois estas concentrações de peçonha resultaram em um halo hemorrágico de 1 cm de diâmetro. As Figuras 3B e C mostram que o ZnDPBG na dose de 45 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., não alterou a resposta hemorrágica à peçonha enquanto que com a dose maior (90 $\mu\text{mol/kg}$) aumentou significativamente a hemorragia observada. O tratamento com L-NAME intradermicamente (300 e 600 nmol/sítio) não alterou a resposta hemorrágica (Fig. 3D), ao contrário da administração i.p. (50 mg/kg) que potencializou esse fenômeno em ambas as doses da peçonha (3 e 10 $\mu\text{g/sítio}$) (Fig. 3E).

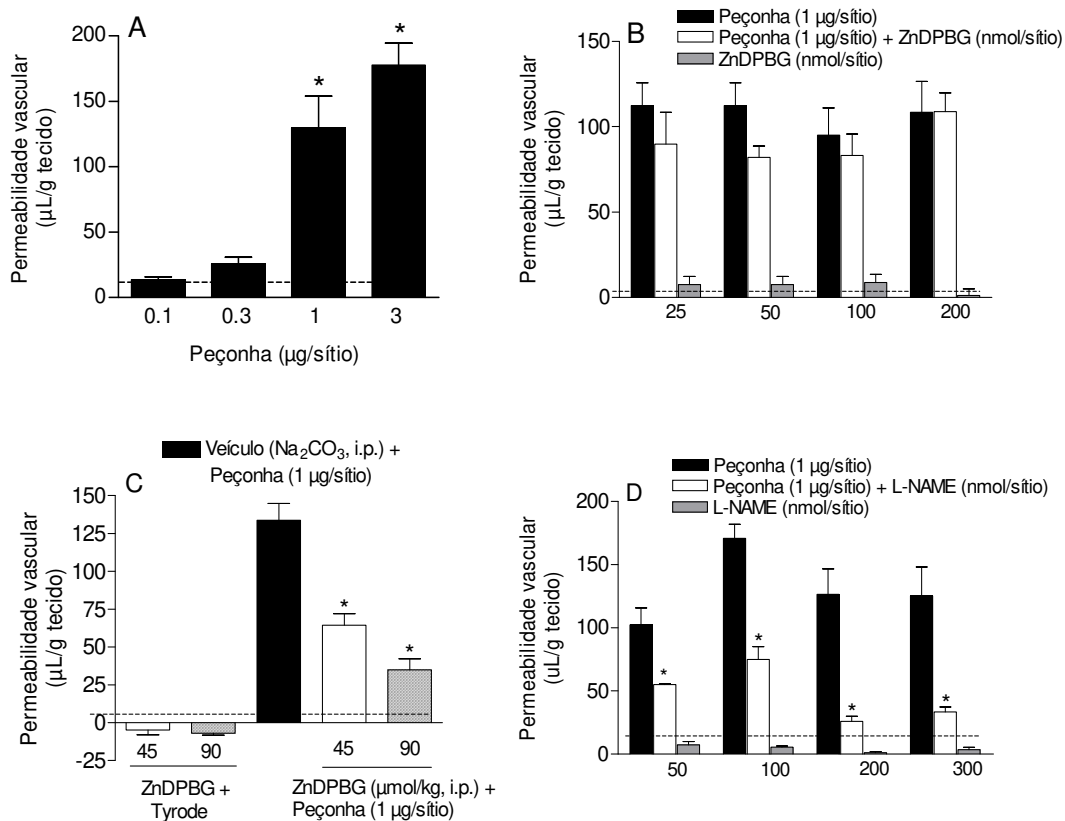


Figura 1- Efeito na permeabilidade vascular causado pela peçonha de *B. jararacussu* e a influência do ZnDPBG e do L-NAME. **A.** Permeabilidade vascular na presença de diferentes doses da peçonha. Em **B**, o ZnDPBG foi co-injetado i.d. com a peçonha, ao passo que em **C**, administrado i.p. 30 min antes. Os camundongos tratados com solução Tyrode ou peçonha i.d. receberam igual volume do veículo do inibidor. Em **D**, o L-NAME foi co-injetado i.d. com a peçonha. Em todos os painéis a linha tracejada representa a resposta com a solução Tyrode. A permeabilidade vascular foi avaliada 30 min após a administração da peçonha pela quantidade de ¹²⁵I-albumina presente na pele comparada com a do plasma. As colunas representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparados com a solução Tyrode em **A** e em **B**, **C** e **D** comparados com a peçonha sozinha (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

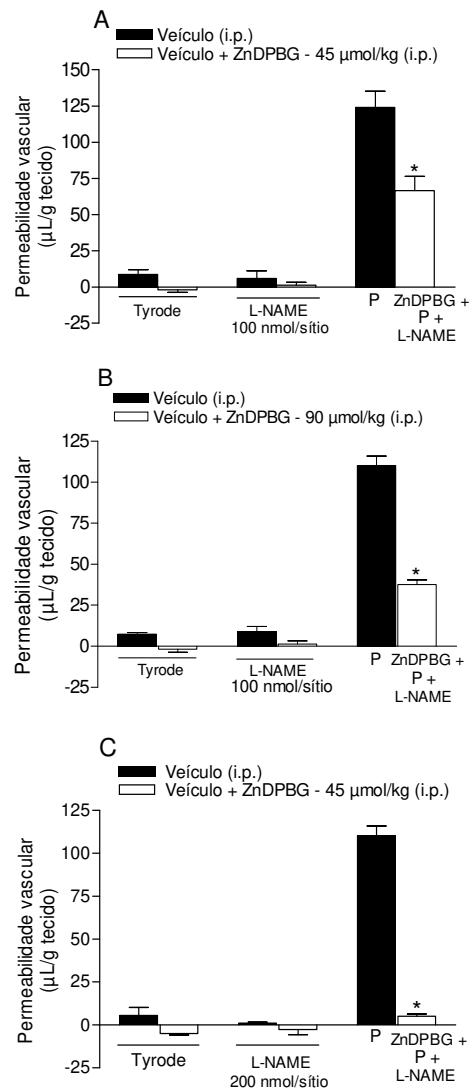


Figura 2- Efeito na permeabilidade vascular causado pela peçonha (P) de *B. jararacussu* (1 µg/sítio) no co-tratamento com L-NAME e ZnDPBG (veículo: Na₂CO₃).
A. Co-tratamento com L-NAME (100 nmol/sítio) + ZnDPBG (45 µmol/kg, i.p.).
B. Co-tratamento com L-NAME (100 nmol/sítio) + ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.).
C. Co-tratamento com L-NAME (200 nmol/sítio) + ZnDPBG (45 µmol/kg, i.p.).
 Em todos os painéis a permeabilidade vascular foi avaliada 30 min após a administração da peçonha pela quantidade de ¹²⁵I-albumina presente na pele comparada com a do plasma. As colunas representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparados com a peçonha sozinha (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

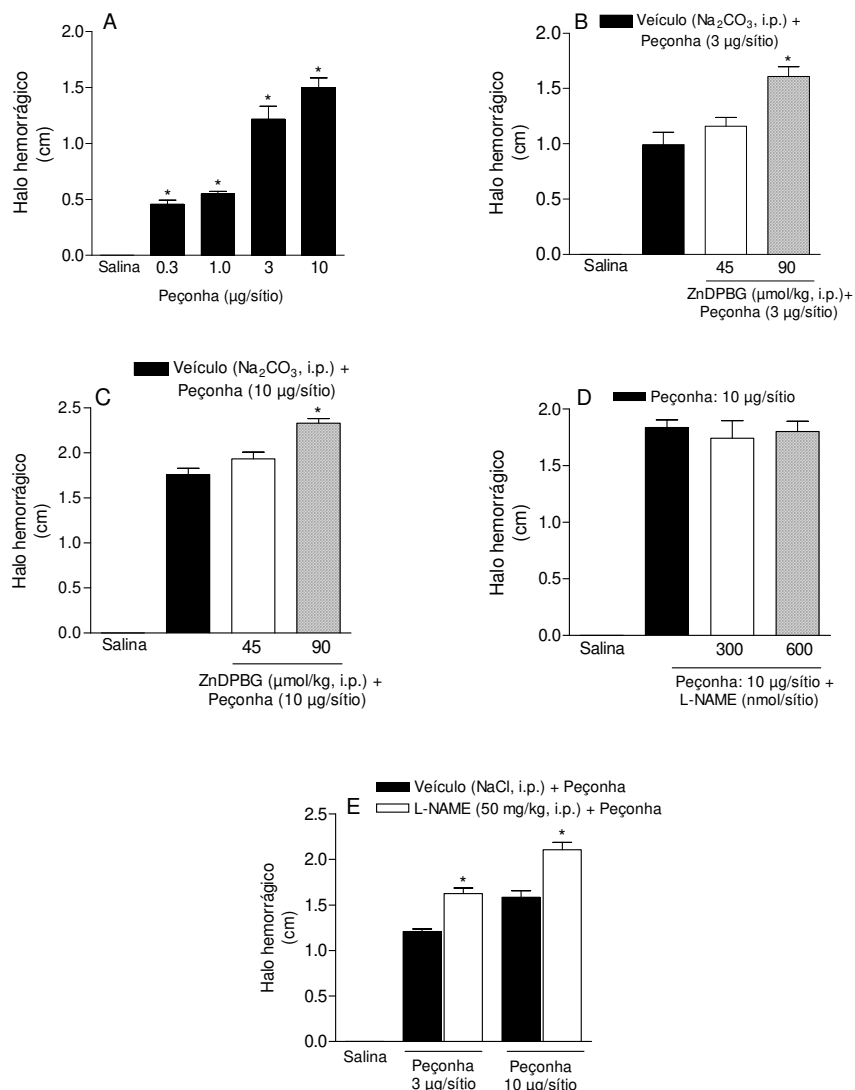


Figura 3- Atividade hemorrágica da peçonha de *B. jararacussu* e o efeito do ZnDPBG e do L-NAME. **A.** Curva dose-resposta da atividade hemorrágica da peçonha de *B. jararacussu*. Em **B** e **C**, o ZnDPBG (45 e 90 µmol/kg, i.p.) foi administrado 30 min antes da peçonha. **D.** O L-NAME (300 e 600 nmol/sítio) foi co-injetado i.d. com a peçonha, ao passo que em **E** administrado i.p. 30 min antes (50 mg/kg). Em todos os painéis o halo hemorrágico foi determinado 2 h após a administração da peçonha. As colunas representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparado com a solução salina (0,9%) em **A** ou com a peçonha sozinha em **B**, **C** e **E** (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

5.3- Mionecrose

5.3.1- Atividade enzimática da HO

A Figura 4 mostra a atividade enzimática da HO em músculo gastrocnêmio de camundongos em diferentes intervalos de tempo após injeção da peçonha nas doses de 25 µg e 75 µg (As doses escolhidas da peçonha foram semelhantes a de Queiroz *et al.*, 1984).

Observe-se aumento da atividade da HO em dois momentos – um precoce (nas primeiras horas após o envenenamento – fase de lesão aguda) e um tardio (alguns dias após a injeção de peçonha, fase de regeneração muscular). A fase precoce foi mais marcante com a dose de 75 µg, porém com esta dose houve pouca fase tardia, ou possivelmente um retardamento no seu aparecimento (talvez devido à extensa lesão produzida na fase precoce). Não houve alteração significativa na atividade da HO no músculo contralateral com qualquer dose ou intervalo de tempo, o que sugere ausência de efeito sistêmico da peçonha sobre HO.

5.3.2- Expressão gênica da HO-1 e HO-2 através do PCR em tempo real

A Figura 5 mostra a expressão gênica da HO-1 e HO-2 em músculo gastrocnêmio de camundongos em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6, 12, 24 e 48 h) após injeção de 75 µg da peçonha de *B. jararacussu*. Nas primeiras horas após o envenenamento (3-12 h pós-peçonha) ocorreu aumento na expressão da HO-1 (isoforma induzível), com retorno ao normal nos intervalos de 24 h e 48 h. Já com a HO-2 (isoforma constitutiva) houve aumento significativo apenas em 24 h (com tendência para aumento em 12 h). A expressão gênica em intervalos >48 h foi avaliada, mas por motivos desconhecidos não foram obtidos resultados fidedignos, devido à variação na expressão da β-actina e GAPDH (o RNA das amostras destes intervalos maiores foi preparado nas mesmas condições e concomitantemente com o dos intervalos de até 48 h).

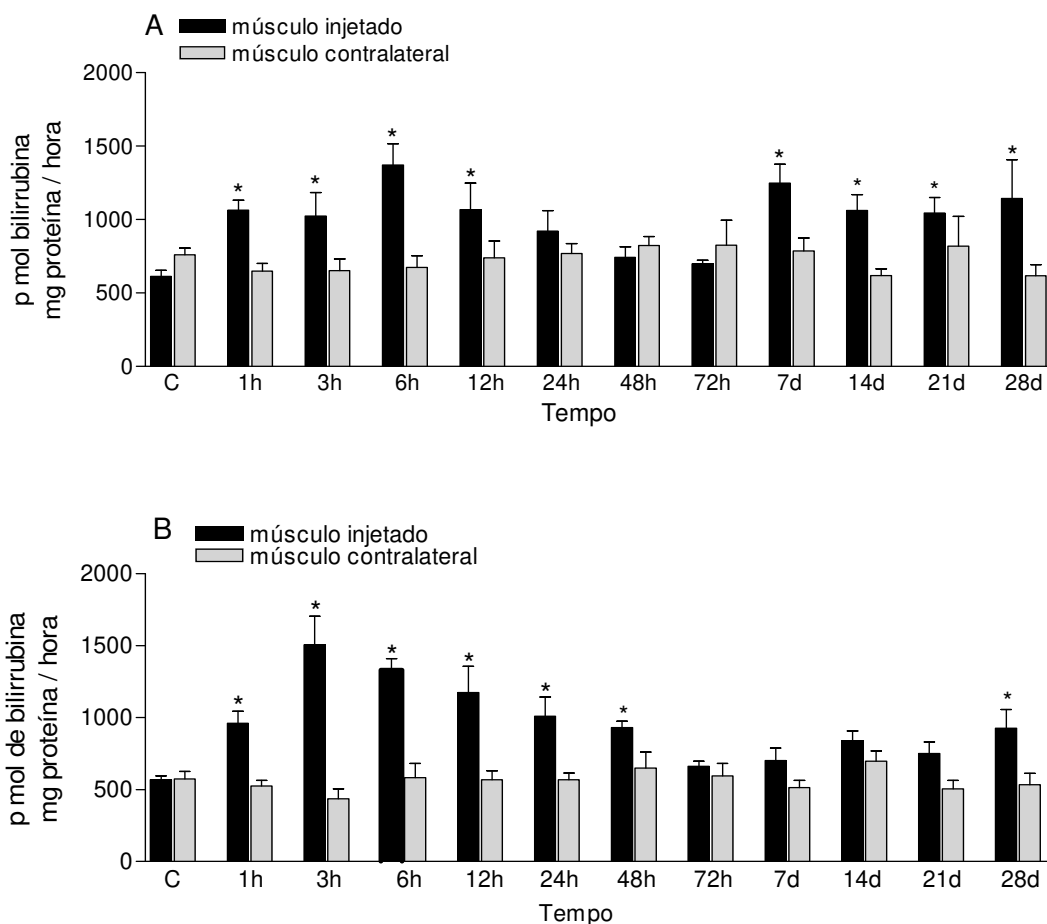


Figura 4- Atividade da HO em músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 25 µg (**A**) e 75 µg (**B**) de peçonha de *B. jararacussu* em diferentes intervalos de tempo. Em camundongos controles (coluna C), foi injetado PBS (50 mM pH 7,4) sem peçonha. O músculo contralateral (não-injetado) também foi analisado. A atividade da HO foi avaliada pela formação de bilirrubina, como descrito em métodos. As colunas representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparados com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

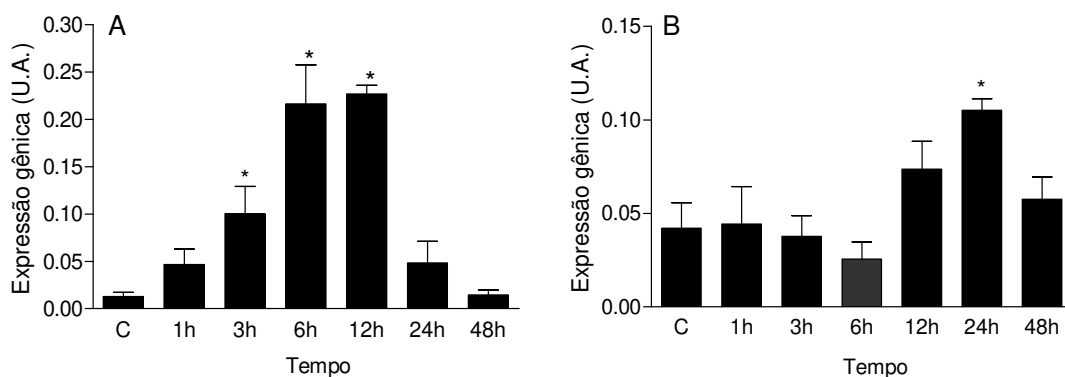


Figura 5- Expressão gênica da HO-1 (A) e HO-2 (B) em músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 75 µg da peçonha de *B. jararacussu* em diferentes intervalos de tempo. Em camundongos controles (coluna C) foi injetado PBS (50 mM pH 7,4) sem peçonha. A expressão gênica foi avaliada pelo método de PCR em tempo real e o resultado expresso em unidades arbitrárias de expressão. As colunas representam a média ± EPM (n=4). *p<0,05 comparados com o controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

5.3.3- Perfil de dano e regeneração muscular (histologia)

As Figuras 6(A-S) mostram as alterações histológicas em diferentes estados patológicos e graus de regeneração que ocorreram no músculo gastrocnêmio após injeção da peçonha nas doses de 25 µg e 75 µg através da coloração hematoxilina-eosina.

Os músculos controles (injetados com PBS 50 mM, pH 7,4) apresentaram um padrão histológico típico de músculo esquelético normal, ou seja, sem nenhum sinal de alteração nas fibras musculares. Os núcleos das fibras estavam localizados na periferia destas células (Fig. 6A,B,P,R).

No músculo injetado com peçonha, foi possível distinguir três fases de dano e regeneração. A fase 1 compreendeu os períodos 1, 3 e 6 h na dose de 25 µg (Fig. 6C,E) e 1, 3, 6 e 12 h na dose de 75 µg (Fig. 6D,F) e foi caracterizada principalmente por hemorragia acentuada e mionecrose (lesões delta, hipercontração dos filamentos alternando com espaços celulares desprovidos de miofibrilas, fibras com vacúolos e sem núcleo) (para mionecrose vide Fig. 6C,D, E,F,Q). Algumas áreas apresentaram infiltrados inflamatórios localizados.

A fase 2 incluiu os períodos 12, 24, 48 e 72 h na dose de 25 µg (Fig. 6G,I) e 24, 48 e 72 h na dose de 75 µg (Fig. 6H,J) e foi caracterizada principalmente pela presença de infiltrados inflamatórios e miotubos. Devido à grande quantidade de núcleo dessas células, o tecido muscular adquiriu aspecto basófilo (principalmente em 72 h) (Fig. 6I,J). Havia ainda a presença de hemorragia e de lesões mionecróticas.

A fase 3 compreendeu os períodos 7, 14, 21 e 28 dias nas doses de 25 µg e 75 µg (Fig. 6L,N para 25 µg e Fig. 6M,O para 75 µg) e foi caracterizada principalmente por células regenerativas (núcleo localizado centralmente) (Fig. 6S). A primeira semana (7 dias) desta fase continuou marcada pela presença de infiltrado celular e porções localizadas de células de regeneração (Fig. 6L,M). Nas outras semanas (14, 21 e 28 dias), predominaram principalmente as células regenerativas (Fig. 6N,O).

A coloração com vermelho de picrossírius foi usada para avaliar a presença de colágeno no músculo injetado com peçonha (foram avaliadas apenas as alterações causadas pela dose de 75 µg). No músculo controle, o colágeno apresentou-se de forma espessa e contínua, frequentemente localizado no epimísio e perimísio (Fig. 7A,B). Nas primeiras horas após o envenenamento a estrutura do colágeno foi semelhante à do controle (1 e 3 h), parecendo afinar-se em algumas porções a partir de 6 h (Fig. 7C,D). O intervalo de 24 a 72 h foi marcado pela presença de infiltrado inflamatório juntamente a alguns depósitos de colágeno (especialmente em 72 h) (Fig. 8A,B). A partir do sétimo dia foi possível observar a presença de células regenerativas circundadas por colágeno, sendo mais acentuada em 28 dias (Fig. 7E,F e Fig. 8C,D).

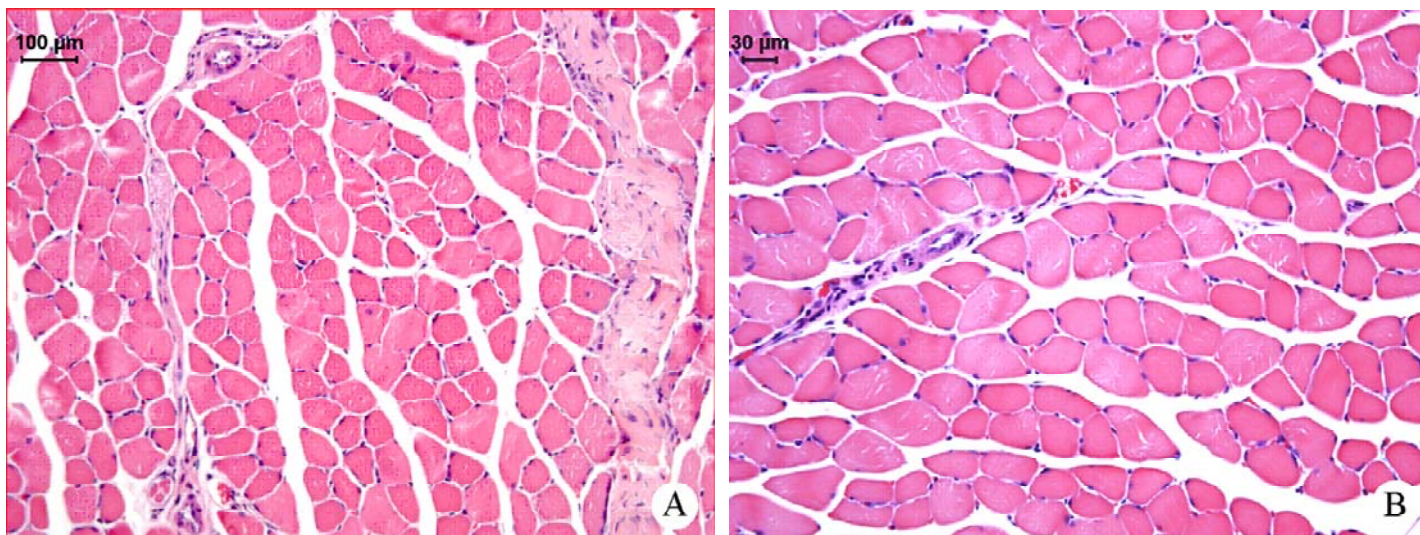


Figura 6- Aspecto histológico de secção transversal de músculo controle (normal) injetado com PBS 50 mM, pH 7,4.
Coloração: Hematoxilina-eosina.

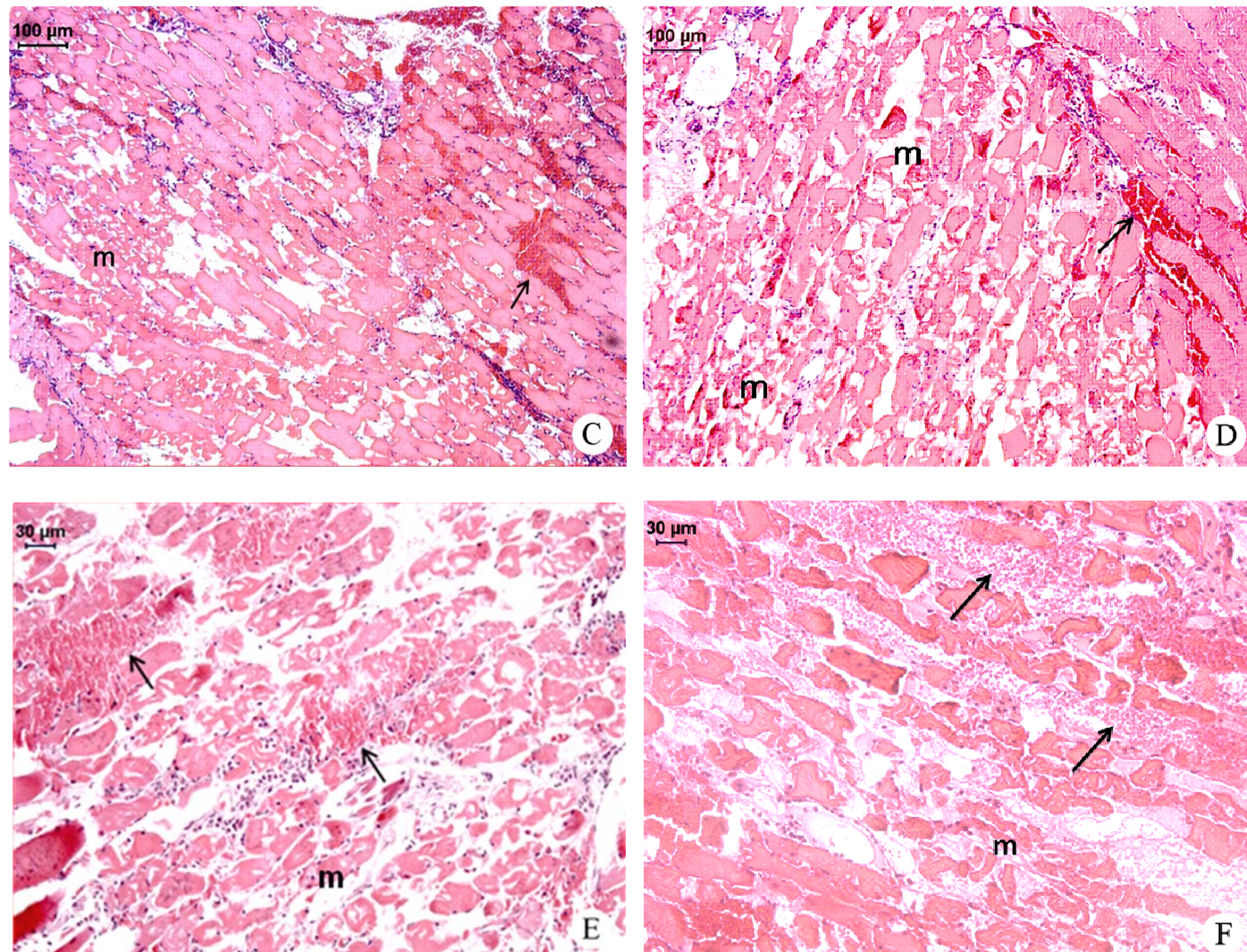


Figura 6- Aspecto histológico de secção de músculo na fase 1 após injeção de peçonha de *B. jararacussu*, nas doses de 25 µg (C,E) e 75 µg (D,F). **Setas** – hemorragia, **m** – mionecrose. Fase 1 compreende períodos de 1, 3 e 6 h (25 µg) e 1, 3, 6 e 12 h (75 µg). Coloração: Hematoxilina-eosina.

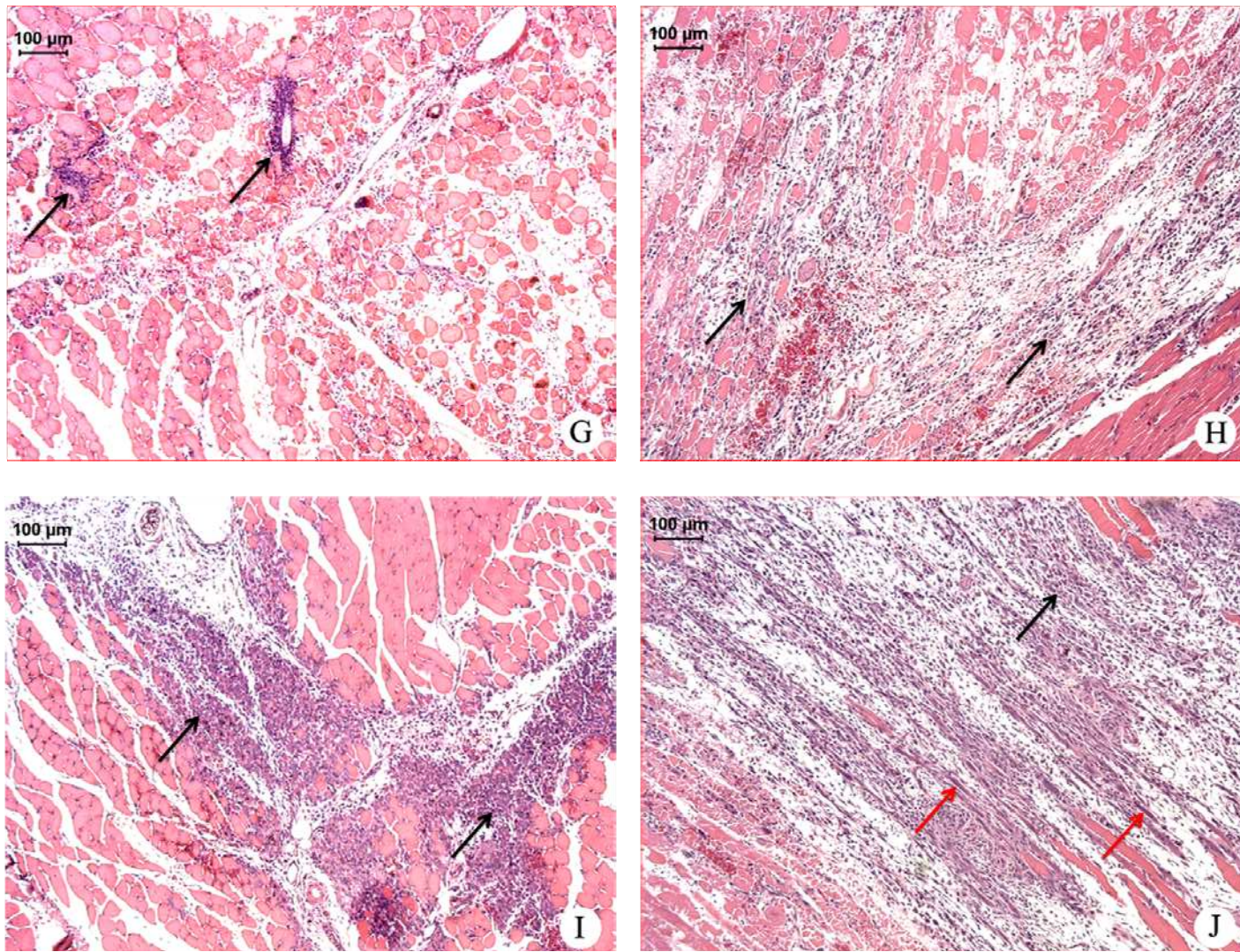


Figura 6- Aspecto histológico de secção de músculo na fase 2 após injeção de peçonha de *B. jararacussu*, nas doses de 25 µg (G,I) e 75 µg (H,J). **Seta preta** – infiltrado inflamatório, **seta vermelha** - miotubos. Fase 2 compreende períodos de 12, 24, 48 e 72 h (25 µg) e 24, 48 e 72 h (75 µg). Coloração: Hematoxilina-eosina.

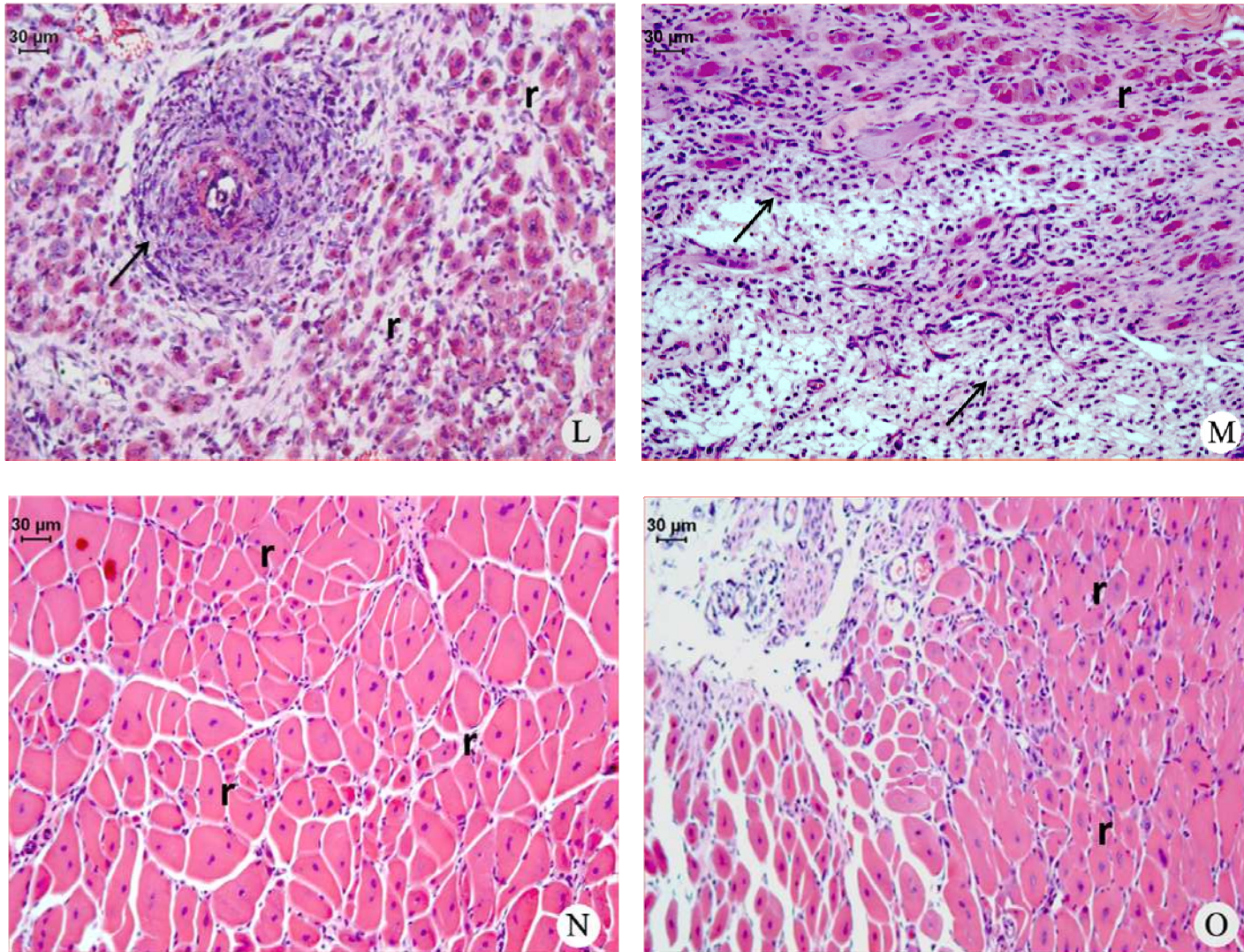


Figura 6- Aspecto histológico de secção de músculo na fase 3 após injeção de peçonha de *B. jararacussu*, nas doses de 25 µg (L,N) e 75 µg (M,O). **Setas** – infiltrado inflamatório, **r** – células regenerativas (núcleos centralizados). Fase 3 compreende períodos de 7, 14, 21 e 28 dias em ambas as doses. Coloração: Hematoxilina-eosina.

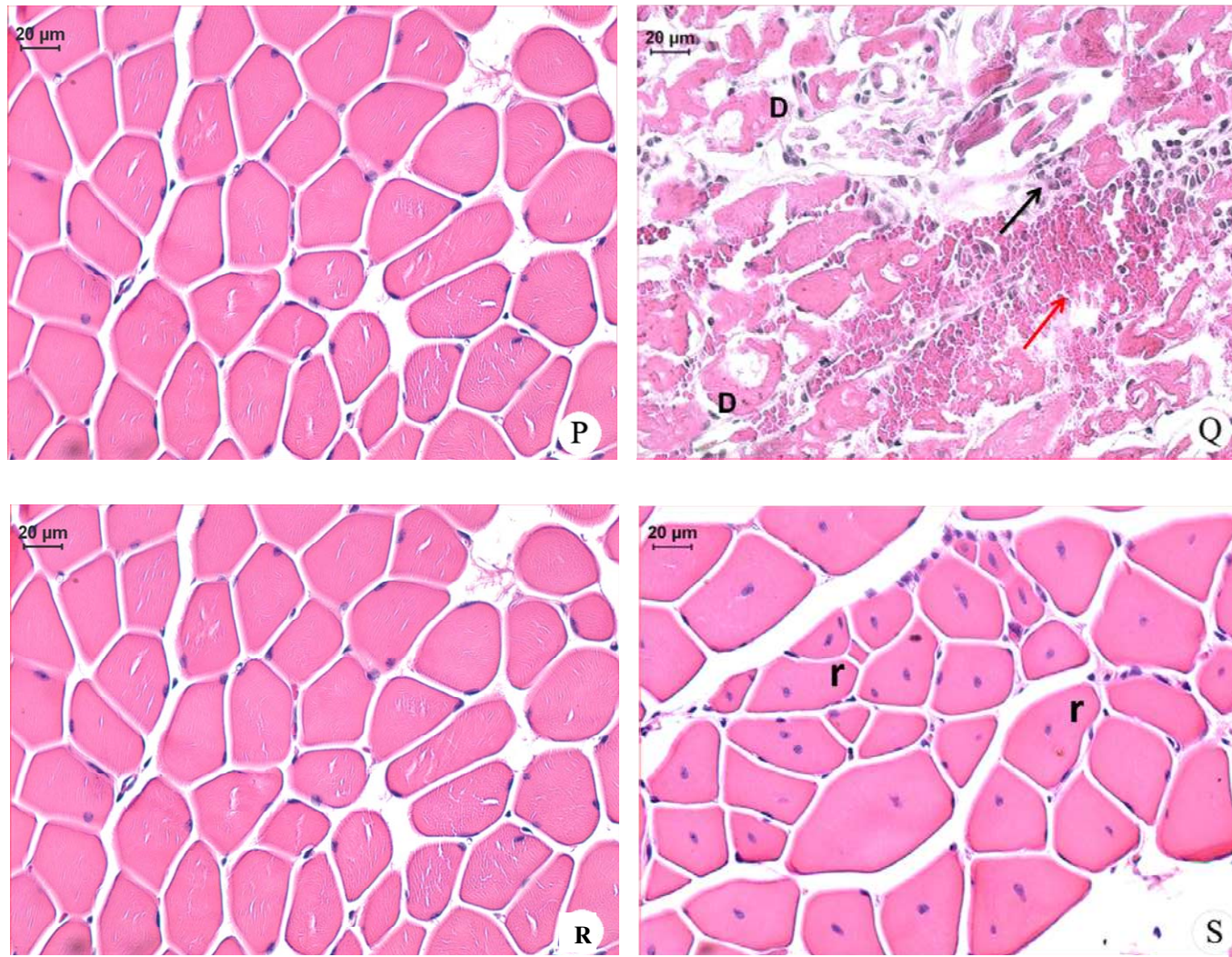


Figura 6- Aspecto histológico de secção músculo controle (**P** e **R**) e injetado com peçonha de *B. jararacussu* (75 µg) (**Q** e **S**).
 Note lesões delta (representada por **D**), infiltrado celular (representado por **seta preta**), hemorragia (representado por **seta vermelha**) e células regenerativas (representada por **r**).
 Coloração: Hematoxilina-eosina.

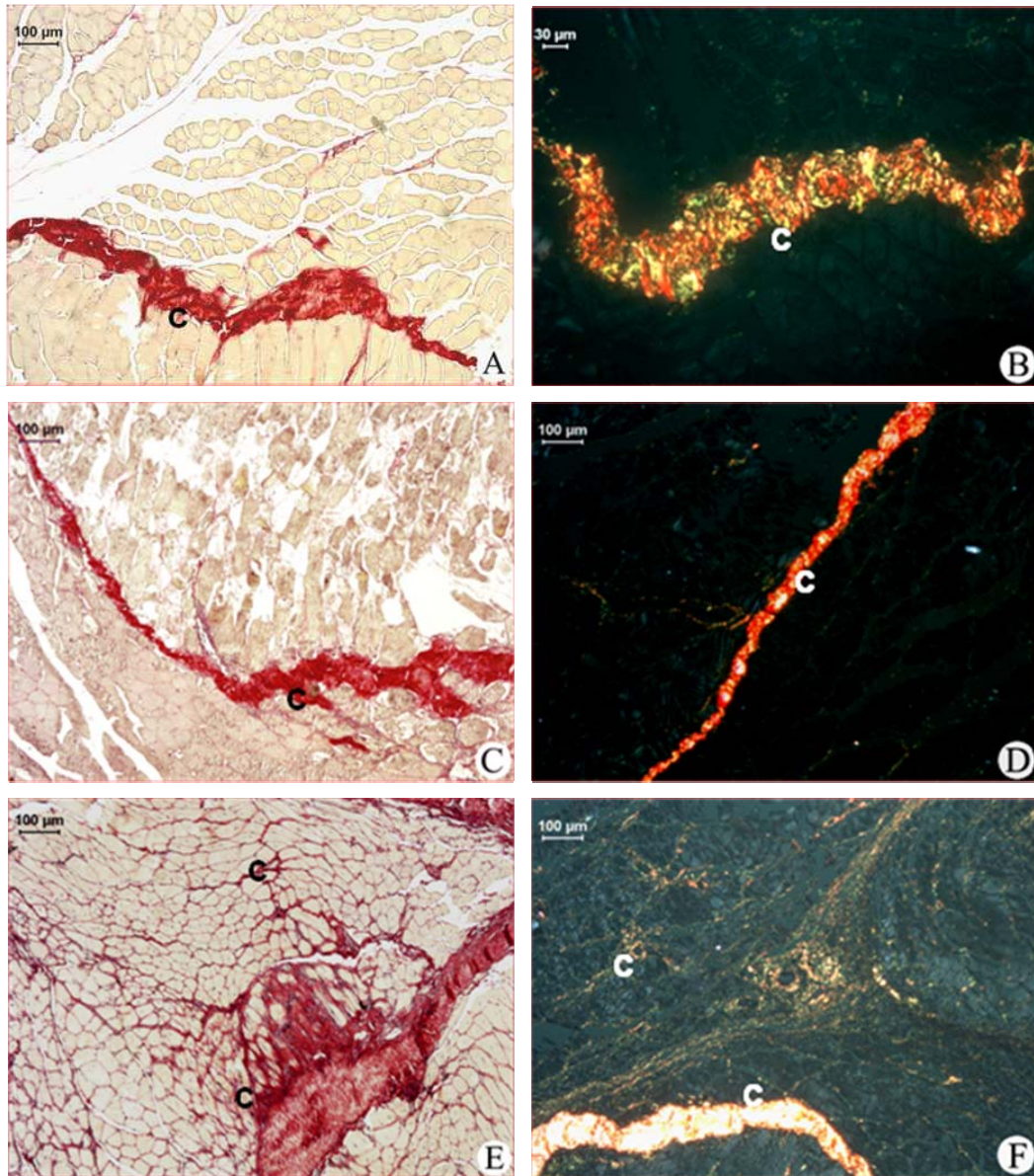


Figura 7- Aspecto histológico de secção de músculo gastrocnêmio injetado com 75 μg da peçonha de *B. jararacussu* corado com vermelho de picrosirius para detecção de colágeno. **A** e **B** mostram o colágeno no músculo controle. **C** e **D** mostram o colágeno entre 6 e 12 h após o envenenamento, e **E** e **F** mostram o colágeno no período de regeneração muscular (7 a 28 dias). c = colágeno. **A,C,E** – luz normal, **B,D,F** – luz polarizada.

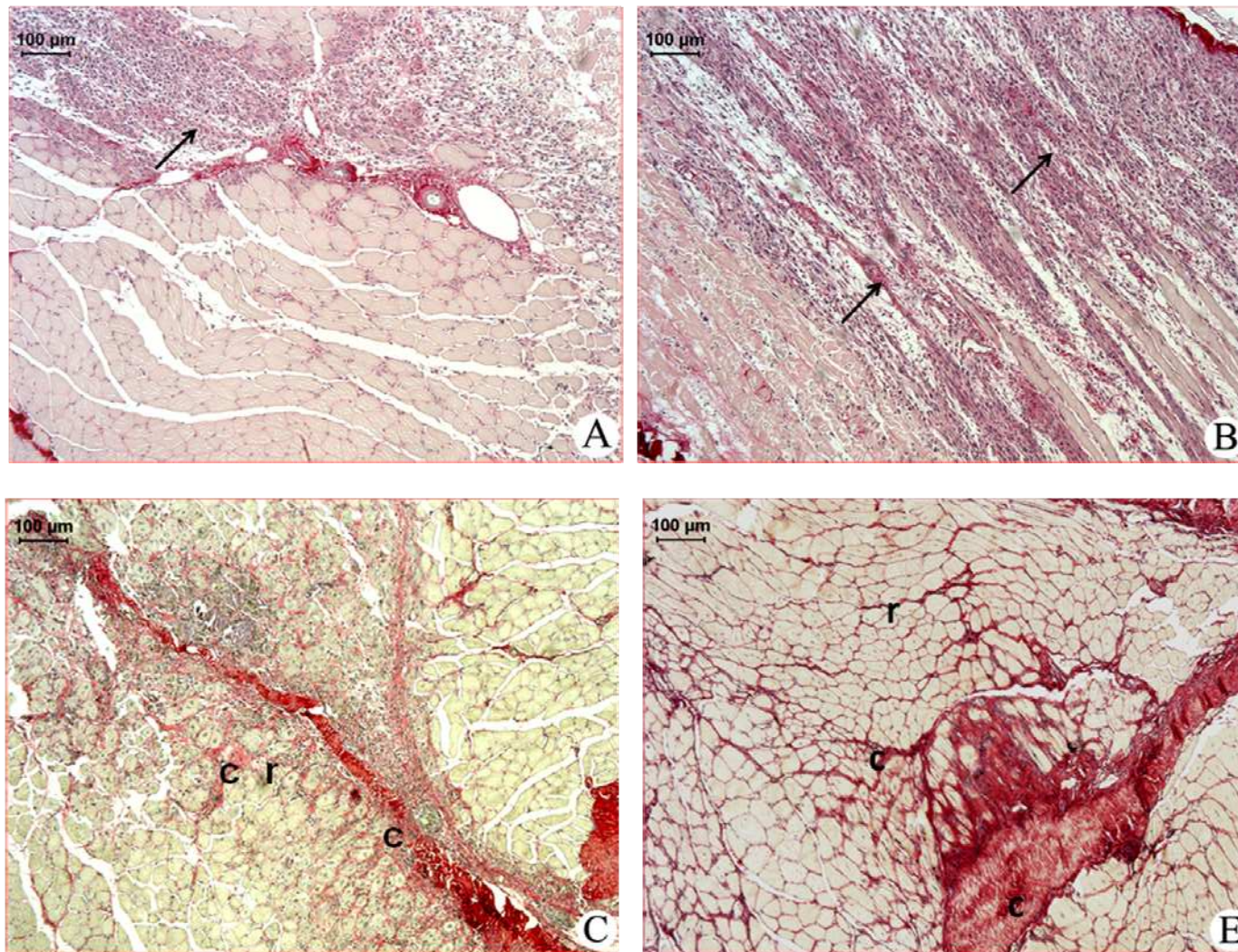


Figura 8- Detecção de colágeno em músculo gastrocnêmio injetado com peçonha de *B. jararacussu* (75 µg). **A e B:** ocorrência concomitante do colágeno com o infiltrado inflamatório no período de 24 a 72 h (representado por seta). **C e D:** presença de colágeno (c) ao redor das células regenerativas (r) a partir do sétimo dia. Luz normal em todos os painéis. Coloração: Vermelho de picrosirius.

5.4- Efeito do tratamento com o inibidor ZnDPBG sobre a mionecrose

5.4.1- Atividade da HO

A Figura 9 mostra que o tratamento com ZnDPBG (90 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) reduziu o aumento da atividade da HO causada pela peçonha (75 μg) nos intervalos de 1 h e 3 h ($40\pm 8\%$ e $41\pm 12\%$, respectivamente); não houve inibição em intervalos ≥ 6 h.

5.4.2- Atividade da creatinoquinase (CK)

A Figura 10A mostra a cinética da CK em camundongos injetados com 25 μg e 75 μg de peçonha de *B. jararacussu* no músculo gastrocnêmio em diferentes intervalos de tempo. Níveis elevados de CK foram observados entre 1 h e 6 h após o envenenamento, com o pico em 3 h, sendo as alterações mais marcantes na dose de 75 μg . A Fig. 10B mostra o efeito do ZnDPBG (90 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), administrado 15 min após a injeção de 75 μg da peçonha, reduzindo os níveis de CK nos intervalos de 1 e 3 h.

5.4.3- Análise histológica do dano muscular após tratamento com ZnDPBG

As Figuras 11A e 12D mostram que o tratamento com ZnDPBG reduziu o grau de mionecrose causado pela peçonha, principalmente na primeira hora após o envenenamento ($38\pm 11\%$), seguido por um retorno a níveis normais de dano durante as horas seguintes. Já as Figuras 11B e 12B mostram que o tratamento com ZnDPBG potencializou a hemorragia na primeira hora após o envenenamento, sem afetar essa resposta nos outros intervalos examinados.

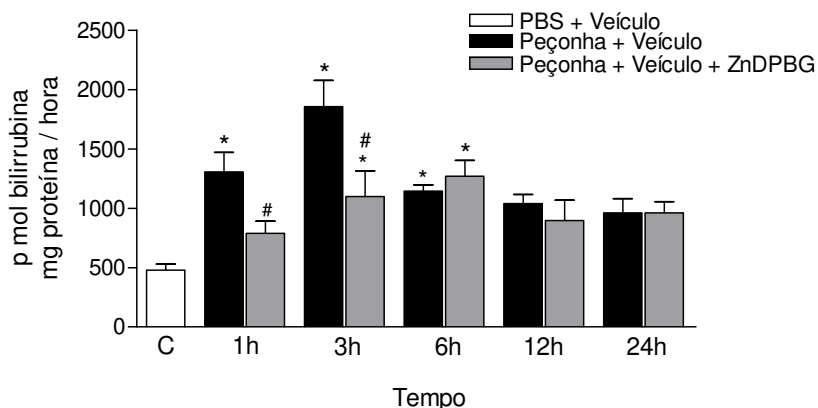


Figura 9- Efeito do ZnDPBG (90 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) sobre a atividade enzimática da HO em músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 75 μg da peçonha de *B. jararacussu* nos intervalos de 1, 3, 6, 12 e 24 h. No grupo controle (coluna C) foi injetado PBS (50 mM pH 7,4) e o veículo (Na_2CO_3 50 mmol/L, i.p.) ao invés de peçonha. A atividade da HO foi avaliada pela formação de bilirrubina como descrito em métodos. As colunas representam a média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ comparados com o grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett), e # $p < 0,05$ comparados com a peçonha (75 μg) + veículo (50 mmol/L Na_2CO_3 , i.p.) (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

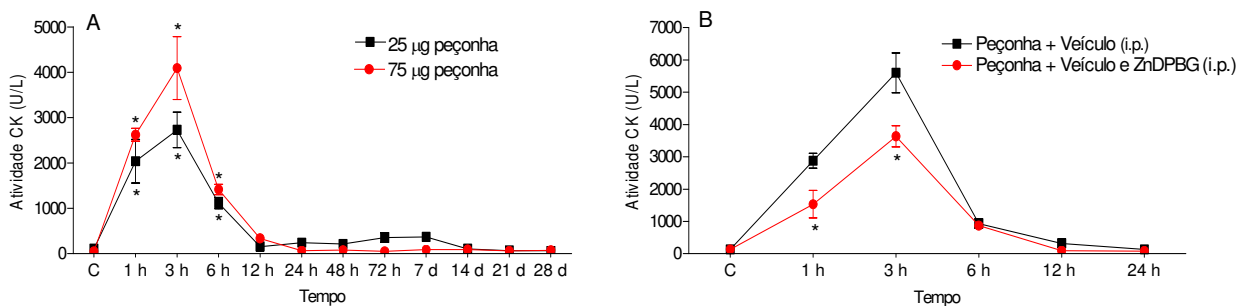


Figura 10- A. Níveis de CK plasmático em camundongos injetados com 25 µg e 75 µg da peçonha de *B. jararacussu* no músculo gastrocnêmio em diferentes intervalos de tempo. **B.** Níveis de CK plasmático em camundongos injetados com 75 µg da peçonha e ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.) em 1, 3, 6, 12 e 24 h. Em **A** e **B**, a atividade de CK foi representada por unidades de CK por litro (U/L). Os pontos representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparados com o controle (C) injetado apenas com PBS (50 mM pH 7,4) (**A**) e com a peçonha (75 µg) + veículo (50 mmol/L Na₂CO₃, i.p.) (**B**) (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett - **A**, e ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni - **B**).

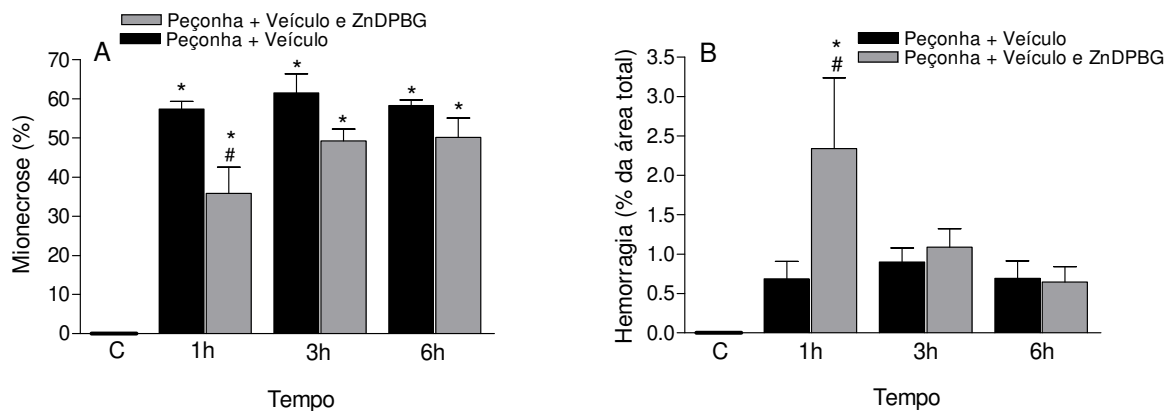


Figura 11- Análise histológica da mionecrose (A) e hemorragia (B) em músculo gastrocnêmio injetado com 75 µg da peçonha de *B. jararacussu* na ausência e presença de ZnDPBG (90 µmol/kg, i.p.) em 1, 3 e 6 h. Em A, contou-se o número de células lesadas em relação ao número total de células por campo, e o valor expresso em porcentagem ao passo que em B, mediu-se a área de extensão de hemorragia comparada a área total de cada campo e o valor expresso em porcentagem. As colunas representam a média ± EPM (n=6). *p<0,05 comparado com o grupo controle (C, injetado apenas com PBS 50 mM pH 7,4 e veículo - Na₂CO₃ 50 mmol/L, i.p.); #p<0,05 comparado com a peçonha (75 µg) + veículo (50 mmol/L Na₂CO₃, i.p.) (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ou Bonferroni).

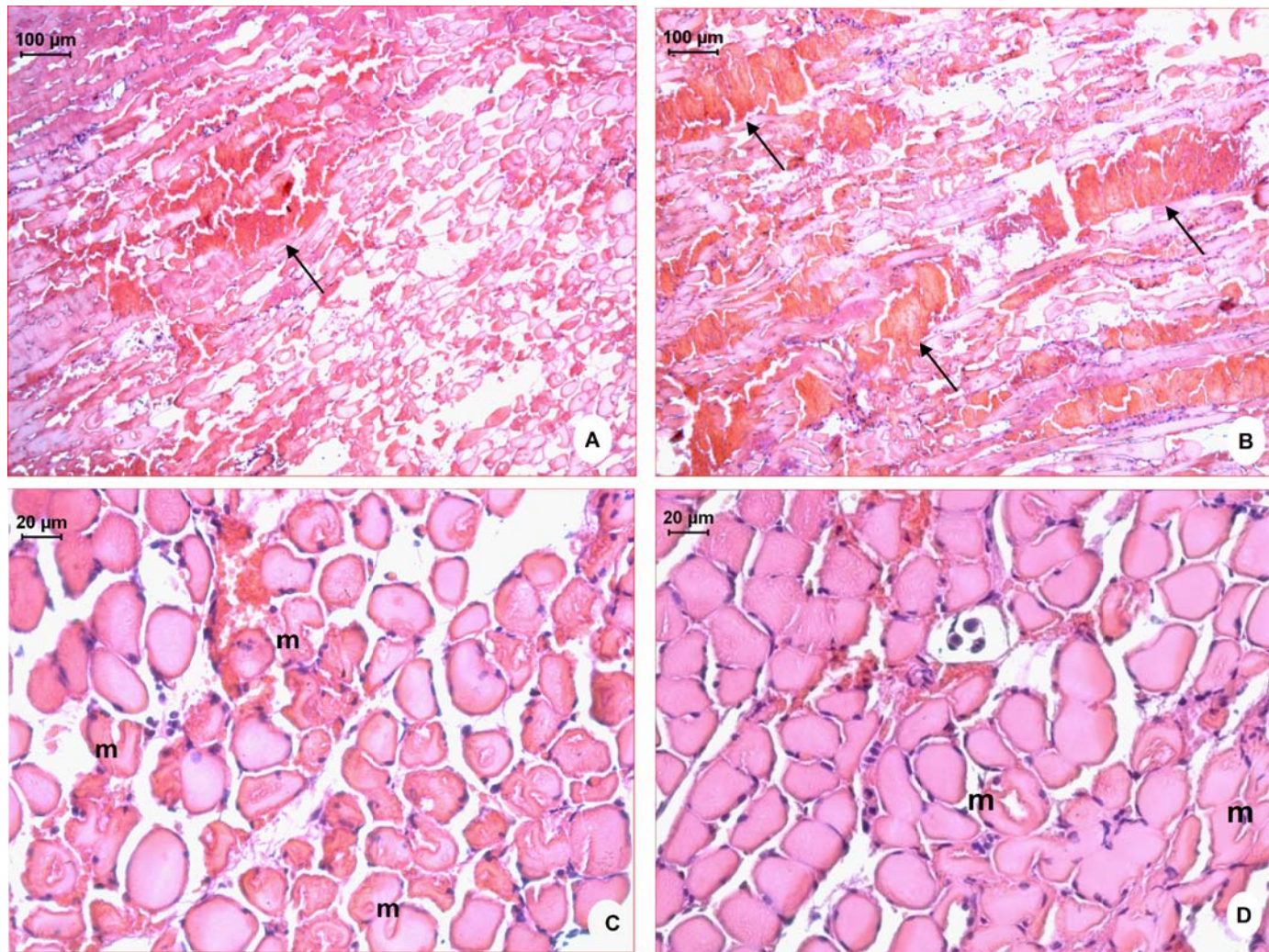


Figura 12- Aspecto histológico de secção de músculo gastrocnêmio injetado com peçonha (75 μg) + inibidor da HO (**B, D**) e apenas injetado com peçonha (75 μg) + veículo (Na_2CO_3 50 mmol/L) (**A, C**). As **setas** representam hemorragia e **m** mionecrose. Coloração: Hematoxilina-eosina.

6- DISCUSSÃO

O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* causa alterações locais como dor, edema, hemorragia e necrose (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Teixeira *et al.*, 2003). Conforme demonstrado aqui, a peçonha de *B. jararacussu* causou edema, hemorragia e necrose em camundongos.

O edema ou aumento de permeabilidade vascular causado por peçonhas botrópicas é multifatorial, podendo envolver uma variedade de mediadores, tais como aminas, cininas, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, NO e outros (Teixeira *et al.*, 2003). Enquanto o papel do NO neste fenômeno é bem reconhecido, pouco se sabe do possível envolvimento do CO em alterações de permeabilidade causadas por peçonhas. Conforme demonstrado aqui, a administração i.p. do ZnDPBG reduziu significativamente e de forma dose dependente o aumento na permeabilidade vascular causado pela peçonha de *B. jararacussu*. Este achado sugere um papel importante para a HO e CO nesta resposta local. A redução na permeabilidade vascular vista aqui poderia estar relacionado à ação vasoconstritora local desse inibidor, uma vez que a dose de 45 $\mu\text{mol/kg}$ eleva a pressão arterial em ratos (Jonhson *et al.*, 2005). Esta ação na vasculatura pode ser facilitada pela rápida distribuição da droga *in vivo* após administração i.p. (Teran *et al.*, 2004). A ausência de efeito quando o inibidor foi administrado i.d. (co-injetado com peçonha) pode estar relacionada eventualmente a problemas farmacocinéticos associados a esta via de administração. De fato, nos trabalhos consultados sobre o uso deste inibidor, a principal via de administração é a i.p. (Jonhson *et al.*, 1995; Teran *et al.*, 2004; Jonhson *et al.*, 2005).

O NO está envolvido em efeitos vasculares de peçonhas botrópicas, especialmente na microcirculação, onde é produzido por células endoteliais dos vasos da derme (Cals-Grierson e Ormerod, 2004), e também por células inflamatórias na região da lesão (Zamunér *et al.*, 2001). Assim, Barbosa *et al.* (2003) e Chaves *et al.* (2006) relataram que o tratamento com L-NAME reduziu o edema de pata induzido pelas peçonhas de *Bothrops insularis* e *Bothrops asper*, respectivamente. Em acordo com estes estudos anteriores, demonstramos aqui que o NO (50, 100, 200 e 300 nmol/sítio, i.d.) também inibiu o aumento na permeabilidade vascular induzido pela peçonha de *B. jararacussu*.

A observação de que tanto o ZnDPBG quanto o L-NAME inibiram o aumento de permeabilidade vascular levou-nos a avaliar o efeito conjunto destes dois inibidores. A inibição vista com L-NAME (100 nmol/sítio) na presença de ZnDPBG (45 ou 90 µmol/kg, i.p.) foi semelhante àquela vista com o ZnDPBG sozinho, indicando ausência de um efeito aditivo ou sinérgico entre as duas substâncias. Esta observação também sugere que há possivelmente uma interação entre as vias de NO e CO na modulação da permeabilidade vascular, com uma regulando a outra de alguma maneira. Esta conclusão é apoiada pela observação de que a inibição foi completa quando a dose de L-NAME foi aumentada para 200 nmol/sítio na presença de ZnDPBG (45 µmol/kg) [ao contrário do que foi visto com o dobro da dose de ZnDPBG (90 mmol/kg) na presença de L-NAME (100 nmol/sítio)], o que sugere que o NO seja o mediador primário que modula a atividade da HO. De fato, há evidências na literatura demonstrando uma interação entre NO e HO, com o NO podendo ativar esta enzima e modular a expressão gênica da mesma (Motterlini *et al.*, 1996; Durante *et al.*, 1997; Bouton *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007). Neste sentido, uma investigação anterior com L-NAME e outro inibidor da heme oxigenase, o crômio-mesoporfirina (CrMP), mostrou que o L-NAME potencializou o efeito vasoconstritor do inibidor da HO (Johnson *et al.*, 2002), sugerindo que o NO modula a ação do CO.

Quanto aos efeitos da hemorragia na pele, os resultados indicam que o ZnDPBG na dose de 90 µmol/kg i.p. em ambas as doses de peçonha potencializou a resposta hemorrágica. Os dados que temos no momento não permitem uma conclusão concreta sobre o mecanismo envolvido, ou seja, se o efeito observado está relacionado à inibição da HO ou apenas a um efeito inespecífico desse inibidor. O L-NAME co-injetado i.d. na pele não alterou a resposta hemorrágica, ao contrário da administração i.p., que na dose de 50 mg/kg potencializou esse fenômeno. Chaves *et al.* (2006) observou que o L-NAME nessa mesma concentração (50 mg/kg, i.p.) aumentou a hemorragia na pele induzida pela peçonha de *B. asper*, talvez porque o aumento da pressão arterial causado pela inibição da NOS levou ao rompimento da integridade da parede vascular após degradação dos componentes da membrana basal por enzimas presentes na peçonha.

As alterações histológicas observadas no presente estudo, tanto em relação à dose de peçonha quanto ao tempo, foram semelhantes às aquelas já descritas por outros autores (Queiróz *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1991; Gutiérrez e Lomonte, 2003), sendo assim, a análise histológica qualitativa mostrou que a hemorragia e a necrose são os eventos iniciais após a injeção da peçonha (Fase 1). A hemorragia nas primeiras horas foi acentuada (1, 3 e 6 h), diminuindo gradativamente em intervalos posteriores, e refletiu a capacidade desta peçonha em causar extenso dano na microvasculatura local (Queiróz *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1991; Santo Neto *et al.*, 2004; Santo Neto e Marques, 2005). As primeiras alterações observadas como indícios da mionecrose foram as lesões delta (espaços triangulares nas fibras transversais, com a base do triângulo na membrana plasmática) seguida de hipercontração dos filamentos (talvez em decorrência do rápido e incontrolado influxo de cálcio) (Ownby e Colberg, 1988; Gutiérrez *et al.*, 1991).

No presente trabalho, a Fase 2 foi marcada por uma reação inflamatória intensa (a partir de 12 h na dose de 25 µg e a partir de 24 h na dose de 75 µg), sendo de suma importância para a retirada do material necrosado (Gutiérrez *et al.*, 1991). Diversos autores destacam a presença de leucócitos polimorfonucleados (principalmente neutrófilos) e posteriormente de macrófagos (Gutiérrez *et al.*, 1984a,b; Gutiérrez *et al.*, 1990). Os miotubos encontrados nessa fase possuem a função de promover a miogênese e auxiliar na regeneração muscular (Godinho, 2006). A partir do sétimo dia (Fase 3), em ambas as doses, foi possível observar a presença de células com o núcleo localizado centralmente, aspecto típico de células regenerativas. Todas as alterações observadas nesse estudo (Fase 1, 2 e 3) foram mais marcantes com a dose de 75 µg da peçonha. A regeneração muscular é dependente da dose e da presença ou não de toxinas hemorrágicas (Queiroz *et al.*, 1984). Uma regeneração inadequada após o dano causado pela peçonha de *B. jararacussu* pode ser explicada pela diminuição no número de células satélites devido à isquemia, ocorrendo então uma regeneração parcial em doses mais elevadas da peçonha (Queiroz *et al.*, 1984, 2002).

A coloração com vermelho de picrossírius foi utilizada nesse estudo para avaliar a presença de colágeno nos músculos tratados com 75 µg da peçonha de *B. jararacussu*. A análise histológica qualitativa revelou alterações mais acentuadas no tecido muscular a

partir de 24 h, pela presença de infiltrado inflamatório concomitantemente a algumas porções de colágeno. Possivelmente, dentre as células inflamatórias havia a presença de fibroblastos que são responsáveis pela biossíntese de colágeno (Gutiérrez *et al.*, 1984b; Gutiérrez *et al.*, 1986; Teibler *et al.*, 2001). A partir do sétimo dia houve um aumento de colágeno no espaço intersticial e ao redor das células regenerativas; essa deposição de colágeno pode estar associada à regeneração inadequada ocasionada pela peçonha de *B. jararacussu* (Queiroz *et al.*, 1984).

O aumento nos níveis circulantes de CK seguido pelo seu retorno ao normal foi semelhante ao perfil observado para outras peçonhas botrópicas (Gutiérrez *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 2002) e indicou claramente a ocorrência de lesão muscular uma vez que esta enzima é usada como marcador deste dano. A CK é abundante no citosol de fibras musculares esqueléticas e é liberada após dano à membrana plasmática das células musculares (Gutiérrez *et al.*, 1991).

O tratamento dos músculos com ambas as doses da peçonha de *B. jararacussu* resultou em duas fases de aumento na atividade da HO (associada à lesão aguda e a regeneração tardia), sendo mais acentuada na dose maior. O mecanismo envolvido neste aumento de atividade ainda não foi esclarecido, mas poderia em parte estar relacionado à maior formação de NO, levando à uma elevação da atividade e/ou expressão da HO (de modo semelhante ao processo sugerido acima para a permeabilidade vascular) ou poderia estar associada à acentuada hemorragia e o aumento da quantidade de hemoglobina proveniente da hemorragia. Neste contexto, a liberação do grupamento heme presente na hemoglobina poderia criar um meio oxidativo, que influencia na expressão de inúmeros genes (Jazwa *et al.*, 2005). De fato, é conhecida a ativação da HO, especialmente a HO-1, pelo heme que se encontra livre e representa o primeiro mecanismo de defesa contra estresse oxidativo (Wagener *et al.*, 2003; Pae *et al.*, 2008). Quando a hemoglobina no músculo é quantificada como um índice de extensão da hemorragia, um aumento desta hemoglobina já ocorre nos primeiros 30 min após envenenamento (Gutiérrez *et al.*, 1995, 2005; Rucavado *et al.*, 1995).

Conforme demonstrado aqui, no período da regeneração muscular houve aumento na atividade da HO em ambas as doses, sendo que na dose menor essa elevação ocorreu a partir do 7º dia se estendendo até ao 28º dia; no entanto, na dose maior (75 µg), esse aumento ocorreu apenas em 28 dias, talvez devido à maior extensão do dano vascular causado por esta peçonha, prejudicando ainda mais o processo de regeneração. A atividade aumentada da HO provavelmente resultou na formação do CO, que pode exercer um efeito citoprotetor em situações de isquemia prolongada (Kubulus *et al.*, 2004) e pode ativar a expressão do fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), que estimula a angiogênese (Dulak e Józkowicz, 2003; Abraham e Kappas, 2008). Acredita-se que um atraso da angiogênese possa prejudicar a regeneração do músculo esquelético (Ochoa *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual ocorre a regulação dos níveis do VEGF e da angiogênese durante a regeneração do músculo esquelético ainda não foi esclarecido. Por outro lado, o aumento da atividade da HO no período de regeneração pode estar associado à ativação das células satélites, uma vez que a HO-2 está presente em células satélites de fibras musculares do músculo esquelético (Baum *et al.*, 2000).

A análise da expressão gênica da HO-1 e HO-2 por PCR em tempo real revelou um aumento significativo na expressão gênica da HO-1 nas primeiras 12 h após o envenenamento, enquanto houve pouca alteração nos níveis de HO-2 durante as primeiras 48 h (inconsistente, com níveis significativamente elevados apenas em 24 h). A HO-1 é considerada uma isoforma induzida por uma grande variedade de estímulos como estresse oxidativo, hipóxia, óxido nítrico (NO) e o próprio substrato heme (Shibahara, 1988; Ryter *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Uma produção maior destes mediadores durante as primeiras horas do envenenamento poderia explicar o aumento na expressão desta isoforma. Por outro lado, houve pouca alteração na expressão da HO-2, considerada uma isoforma constitutiva (Ryter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007), o que provavelmente reflete seu papel na homeostase normal, em vez de participação em respostas à injúria e dano tecidual.

Estes resultados sugerem que a HO-1 é a principal isoforma responsável pelo aumento na atividade enzimática vista após o envenenamento. Entretanto, houve certa defasagem entre o perfil da atividade enzimática e o da expressão gênica, com o aumento

da atividade ocorrendo primeiro (antecedendo a expressão gênica). Este achado sugere que o aumento inicial de atividade enzimática independe de um aumento na expressão gênica, e aponta para uma ação (direta ou indireta) da peçonha sobre a atividade enzimática, talvez através da ação do NO ou outros mediadores mencionados acima. Este é um aspecto que merece uma investigação mais detalhada.

Em camundongos injetados com 75 µg de peçonha o tratamento com ZnDPBG resultou em uma inibição parcial na atividade da HO em 1 e 3 h, com desaparecimento da inibição em 6 h, possivelmente devido a características farmacocinéticas desse inibidor. Tendo em vista a inibição parcial da atividade da HO pelo ZnDPBG, foi realizada uma análise histológica quantitativa (morfometria) para avaliar os possíveis efeitos desse inibidor sobre a mionecrose. O tratamento com o ZnDPBG aumentou a hemorragia no tecido muscular 1 h após o envenenamento (efeito semelhante a hemorragia observada na pele), mas não mostrou efeito em intervalos posteriores.

O tratamento com ZnDPBG reduziu os níveis plasmáticos de CK nos intervalos de 1 e 3 h, indicando uma redução da lesão muscular, já que a CK é uma enzima que caracteriza a lesão muscular do ponto de vista bioquímico (Gutiérrez *et al.*, 1991). Essa conclusão foi apoiada pela análise histológica quantitativa (morfometria) que identificou uma diminuição no número de células lesadas nas primeiras três horas após o envenenamento. Esse fenômeno sugere que a inibição da HO pode trazer efeitos parcialmente benéficos ao tecido muscular, possivelmente correlacionado a alguns fatores como uma redução na permeabilidade vascular do tecido muscular na presença desse inibidor. Uma outra hipótese é que os níveis aumentados da HO na ausência do inibidor podem estar associados ao aumento do NO (como já explicado anteriormente). De acordo com os estudos de Chaves *et al.* (2006), realizados com a peçonha de *B. asper* em músculo gastrocnêmio de camundongos, houve uma elevação na quantidade de NO 1, 3, 6, 12 e 24 h após a administração da peçonha. Embora o mecanismo pelo qual a peçonha botrópica induz a produção de NO ainda não está bem esclarecido, é provável que envolva o sistema cininas-caliceínas bem como um dano tecidual direto na parede vascular (endotélio e músculo liso vascular) (Petricevich, 2000). Segundo a literatura, a combinação de concentrações elevadas de CO e NO podem ocasionar disfunções mitocondriais, levando à

formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente à peroxidação lipídica (Dulak e Józkwicz, 2003; Abraham e Kappas, 2008). Além disso, na fase de lesão aguda pode haver uma quantidade elevada de hemoglobina (como já explicado anteriormente), e, visto que o CO tem uma maior afinidade pela hemoglobina do que o oxigênio pode ocorrer a formação de um complexo (carboxihemoglobina), reduzindo o transporte de O₂ para os tecidos, resultando assim em hipóxia ou anóxia (Kourembanas, 2002; Scott *et al.*, 2007; Piantadosi *et al.*, 2008). Um aumento da atividade da HO também pode ocasionar um acúmulo de ferro, e este metal, na sua forma livre, é considerado altamente tóxico, podendo levar à formação de espécies reativas de oxigênio, resultando em danos a vários componentes celulares (Abraham e Kappas, 2008). Independente dos possíveis mecanismos envolvidos no dano mediado pela heme-oxigenase, os resultados apresentados aqui demonstram que a inibição desta enzima pode proporcionar alguma proteção contra o edema e a mionecrose. Esses achados abrem uma nova perspectiva de estudo sobre o papel da HO e do CO no dano local causado por peçonhas botrópicas, com possíveis aplicações terapêuticas.

7- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo indicam uma participação da HO no aumento de permeabilidade vascular, hemorragia e mionecrose causadas pela peçonha de *B. jararacussu*, e mostram que a inibição desta enzima com o ZnDPBG pode trazer efeitos benéficos e atenuar o edema e a mionecrose após o envenenamento botrópico.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 79-127.

Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon* 2002; 40: 335-393.

Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2541-2551.

Allbrook D. Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 1981; 4: 234-245.

Appleton SD, Chrétien ML, McLaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH, Marks GS. Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Disposit* 1999; 10: 1214-1219.

Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991; 51: 974-978.

Arce V, Brenes F, Gutiérrez JM. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int J Exp Path* 1991; 72: 211-226.

Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL, Harris KA, Potter RF. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 371-379.

Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratum of endothelium. *J Biol Chem* 1992; 267: 18148-18153.

Baramova EN, Shannon JD, Fox JW, Bjarnason JB. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50: 763-768.

Barañano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 10996-11002.

Barañano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 16093-16098.

Barbosa AM, Amaral RO, Teixeira CFP, Hyslop S, Cogo JC. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. Toxicon 2003; 42: 515-523.

Baum O, Feussner M, Richter H, Gossrau R. Heme oxygenase-2 is present in the sarcolemma region of skeletal muscle fibers and is non-continuously co-localized with nitric oxide synthase-1. Acta Histochem 2000; 102: 281-298.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Höfling MA. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 698-706.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Höfling MA. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. Am J Trop Med Hyg 2002; 67: 217-222.

Bouton C, Demple B. Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Biol Chem 2000; 42: 32688-32693.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. J Exp Med 2000; 192: 1015-1026.

Brusés JL, Capaso J, Katz E, Pilar G. Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. J Neurochem 1993; 60: 1030-1042.

Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. Nitric Oxide 2004; 10: 179-193.

Campbell JA, Lamar WW. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Publishers Inc / Cornell University Press, Ithaca, NY, 2004.

Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, Zaniolo G, Mazzoleni F, Vitiello L. Macrophage secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci* 2002; 23: 189-194.

Cao T, Grant AD, Gerard NP, Brain SD. Lack of a significant effect of the tachykinin neurokinin-1 receptor on wound healing in mouse skin. *Neuroscience* 2001; 108: 695-700.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84, 209-238.

Chaves F, Barbosa M, Gutiérrez JM. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 1995; 33: 31-39.

Chaves F, Teixeira CFP, Gutiérrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm Res* 2006; 55: 245-253.

Cintra AC, Marangoni S, Oliveira B, Giglio JR. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J Protein Chem* 1993; 12: 57-64.

Costa PD, Toyama MH, Marangoni S, Rodrigues-Simioni L, Cruz-Höfling MA. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. *Toxicon* 1999; 37: 1143-1153.

Costa SKP, Starr A, Hyslop S, Gilmore D, Brain SD. How important are NK₁ receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. *Vasc Pharmacol* 2006a; 45: 209-214.

Costa SKP, Yshii LM, Poston RN, Muscará MN, Brain SD. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK₁ receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of edema formation, in response to TNF α in the cutaneous microvasculature. *J Neuroimmunol* 2006b; 171: 99-109.

Díaz C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops godmani* snake venom. Arch Biochem Biophys 1992; 298: 135-142.

Dulak J, Józkwicz A. Carbon monoxide – a “new” gaseous modulator of gene expression. Acta Biochim Pol 2003; 50: 31-47.

Dungey AA, Badhwar A, Bihari A, Kvietys Pr, Harris KA, Forbes TL, Potter RF. Role of heme oxygenase in the protection afforded skeletal muscle during ischemic tolerance. Microcirculation 2006; 13: 71-79.

Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1997; 80: 557-564.

Elias CS, Thattassery E, Martinez AMB, Melo PA. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. Braz J Med Bio l Res 2002; 35: 1233-1235.

Essig DA, Borger DR, Jackson DA. Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions. Am J Physiol 1997; 272: C59-C67.

Ewing JF, Maines MD. Glutathione depletion induces heme oxygenase-1 (HPSP32) mRNA and protein in rat brain. J Neurochem 1993; 60: 1512-1519.

Fan HW, Cardoso JLC. Clinical toxinology of snake bites in South America. In: *Handbook of Clinical Toxinology of Animals Venoms and Poisons* (Meier J, White J, eds.) 1995; pp. 667-668. CRC Press:Boca Raton.

Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, França FOS, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality. Toxicon 1992; 30: 1603-1608.

Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE., Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999; 339: 729-736.

França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds) 2003; pp. 72-86. Sarvier/FAPESP: São Paulo.

Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 2005; 45: 969-985.

Godinho RO. *In vitro* development of skeletal muscle fiber. *Braz J Morphol Sci* 2006; 23: 173-186.

Grounds M. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 1-22.

Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1984a; 40: 367-379.

Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and myotoxin from the snake *Bothrops asper* (fer-de-lance). *Toxicon* 1984b; 22: 719-731.

Gutiérrez JM, Chaves F, Mata E, Ceras L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) venom. *Toxicon* 1986; 24: 223-231.

Gutiérrez JM, Chaves F, Gené JA, Lomonte B, Camacho Z, Schosinsky K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 1989; 27: 735-746.

Gutiérrez JM, Arce V, Brenes F, Chaves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1990; 52: 25-36.

Gutiérrez JM, Nunez J, Díaz C, Cintra AC, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mo Pathol* 1991; 55: 217-229.

Gutiérrez JM, Romero M, Nunez J, Chaves F, Borrow G, Ovadia M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol* 1995; 62: 28-41.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405-1424.

Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000; 82: 841-845.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds.) 2003; pp. 310-323. Sarvier/FAPESP: São Paulo.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42: 915-931.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005; 45: 997-1011.

Harris JB, Cullen MJ. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc Rev* 1990; 3: 183-211.

Harris JB. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 2003; 42: 933-945.

Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; 335: 241-250.

Higuchi M, Single FN, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell Press* 1993; 75: 1361-1370.

Homsí-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988; 26: 615-627.

Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szelag M, Zagorska A, Sroczynska P, Drukala J, Jozkowicz A, Dulak J. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 2005; 40: 1250-1263.

Johnson RA, Lavessa M, Askari B, Abraham NG, Nasjletti A. A heme oxygenase product, presumably carbon-monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension* 1995; 25: 166-169.

Johnson FK, Teram FJ, Prieto-Carrasquero M, Johnson RA. Vascular effects of a heme oxygenase are enhanced in the absence of nitric oxide. *Am J Hypertens* 2002; 15: 1074-1080.

Johnson FK, Johnson RA, Durante W, Jackson KE, Stevenson BK, Peyton KJ. Metabolic syndrome increases endogenous carbon monoxide production to promote hypertension and endothelial dysfunction in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 290: 601-608.

Kanashiro MM, Escocard RCM, Petretski JH, Prates MV, Alves EW, Machado OLT, Dias da Silva W, Kipnis TL. Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* venom. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1179-1186.

Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SE, Choi AMK. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1080-1089.

Kourembanas S. Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 291-299.

Kubulus D, Roesken F, Amon M, Rücker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD. Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2332-H2340.

Kusner LL, Kim E, Kaminski HJ. Heme oxygenase-2 expression at rat neuromuscular junctions. *Neurosci Lett* 1999; 273: 143-146.

Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Inflammatory edema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and *p*-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1289-1294.

Lautier D, Luscher P, Tyrrel RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 1992; 13: 227-232.

Li C, Hossieny P, Wu BJ, Qawasmeh A, Beck K, Stocker R. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antiox Redox Sinal* 2007; 9: 2227-2239.

Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Hannink M, Alam J, Durante W. Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 381-389.

Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, Rutkowski AJ, Cisowski J, Agarwal A, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antiox Redox Sinal* 2008; 10: 1-46.

Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM, Ramires G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani*. *Toxicon* 1990; 28: 75-81.

Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 1993; 17: 93-105.

Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 2003; 42: 885-901.

Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 1992; 30: 1387-1397.

Mazzi MV, Marcussi S, Carlos GB, Stábili RG, Franco JJ, Ticli FK, Cintra ACO, França SC, Soares AM, Sampaio SV. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 2004; 44: 215-223.

McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732.

Milani R, Jorge MT, Ferraz de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JLC, Ribeiro LA, Fan HW, França FOS, Sano-Martins IS, Cardoso D, Fernandez ICOF, Fernandes JC, Aldred VL, Sandoval MP, Puerto G, Theakston RGD, Warrell DA. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q J Med* 1997; 90: 323-334.

Moncada S, Palmer RM, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

Morse D, Choi AMK. Heme oxygenase-1. The “emerging molecule” has arrived. *Am J Resp Cell Mol Biol* 2002; 27: 8-16.

Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 270: H107-H114.

Ochoa O, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, McManus LM, Shireman APK. Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R651-R661.

Ortiz de Montellano PR. The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 221-227.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428.

Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1029-L1037.

Ownby CL, Colberg TR. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). *Toxicon* 1988; 26: 459-474.

Pae HO, Kim EC, Chung HT. Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42: 197-203.

Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2000; 38: 1253-1266.

Piantadosi CA. Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 259-70.

Piantadosi CA. Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 2008; 4: 1-8.

Poulos TL. Structural and functional diversity in heme monooxygenases. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 10-18.

Queiróz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22: 339-346.

Queiróz LS, Marques MJ, Santos Neto H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 2002; 40: 1483-1486.

Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J, Cintra ACO, Giglio JR, Jiang MS, Fletcher JE. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothrospoxin, a Lys 49 phospholipase A_2 myotoxin. *Toxicon* 1995; 33: 1479-1489.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*; 1971: Vol. 2. (Bücherl W, Buckley E, eds.) pp. 345-384. Academic Press: New York.

Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Exp Mol Pathol* 1995; 63: 186-199.

Russell FE, Walter FG, Bey TA, Fernandez MG. Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon* 1997; 1: 99-108.

Ryter SW, Morse D, Choi AMK. Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Science's Stake* 2004; 230: 1-6.

Ryter SW, Alan J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to the therapeutic application. *Physiol Rev* 2006; 86: 583-560.

Santo-Neto H, Vomero VU, Marques MJ. Insights into the loss of muscle mass following *B. jararacussu* venom in mice. *Toxicon* 2004; 44: 847-850.

Santo-Neto H, Marques MJ. Microvessel damage by *B. jararacussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration. *Toxicon* 2005; 46: 814-819.

Santo-Neto H, Vomero VU, Marques MJ. L-Arginine enhances muscle regeneration after experimental envenomation by *B. jararacussu*: a future for nitric oxide-based therapy? *Toxicon* 2006; 48: 353-357.

Seta F, Bellner L, Rezzani R, Regan RF, Dunn MW, Abraham NG, Gronert K, Laniado-Schwartzman M. Heme oxygenase-2 is a critical determinant for execution of an acute inflammatory and reparative response. *Am J Pathol* 2006; 169: 1612-1623.

Scott JR, Chin BY, Bilban MH, Otterbein LE. Restoring homeostasis: is heme oxygenase-1 ready for the clinic? *Pharmacol Sci* 2007; 28: 200-205.

Shibahara S. Regulation of heme oxygenase gene expression. *Semin Hematol* 1988; 25: 370-376.

Soares de Moura R, Aguiar AS, Melgarejo AR, de Carvalho LC. Pharmacological aspects of mouse hind-paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata*. *Toxicon* 1998; 36: 771-780.

Tan NH, Saifuddin MN. Comparative study of the edema-inducing activity of snake venoms. *Comp Biochem Physiol C* 1990; 97: 293-296.

Taillé C, Foresti R, Lanone S, Zedda C, Green C, Aubier M, Motterlini R, Boczkowski J. Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 753-761.

Teibler P, Perez OA, Maruñak S, Negrette MS, Ortega H. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. *Biocell* 2001; 25: 257-264.

Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003; 42: 947-962.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 61: 748-755.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. J Biol Chem 1969; 244: 6388-6394.

Teran FJ, Johnson RA, Stevenson BK, Peyton KJ, Jackson KE, Appleton SD, Durante W, Johnson FK. Heme oxygenase-derived carbon monoxide promotes arteriolar endothelial dysfunction and contributes to salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 288: R615-R622.

Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull WHO 1983; 61: 949-956.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol 2005; 288, 345-353.

Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. Agents Actions 1989; 26: 292-300.

Ulman M, Oldfors A. Skeletal muscle regeneration in young rats is dependent on growth hormone. J Neurol Sci 1991; 106: 67-74.

Vacharajani TJ, Work J, Sekutz AC, Granger DN. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 278: H1613-H1617.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 3: 34.1-34.11.

Vesely MK, Exon DJ, Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators *in vitro*. Am J Physiol 1998; 275: C1087-C1094.

Vesely MJ, Sanders R, Green CJ, Motterlini R. Fibre type specificity of haem oxygenase-1 in rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1999; 458: 257-260.

Vreman HJ, Wong RJ, Stevenson DK. Sources, sinks and measurement of carbon monoxide. In: *Carbon Monoxide and Cardiovascular Functions*. (Wang R, ed.) 2002; pp. 45-65. CRC Press: Boca Raton.

Wagener FA, VAN Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG. The heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood* 2003; 102: 521-528.

Watt G. Snakebite treatment and first aid. In: *The Venomous Reptiles of Latin America* (Campbell JA, Lamar WW, eds.) 1989; pp. 6-13. Comstock Publishing/Cornell University Press: Ithaca, NY.

Wilks A. Heme oxygenase: evolution, structure, mechanism. *Antiox Redox Signal* 2002; 4: 603-614.

Xia ZW, Zhou WP, Cui WJ, Zhang WH, Shen QX, Li YZ, Yu SC. Structure prediction and activity analysis of human heme oxygenase-1 and its mutant. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2352-2356.

Yet SF, Melo LG, Layne MD, Perrella MA. Heme oxygenase 1 in regulation of inflammation and oxidative damage. In: *Methods in Enzymology* 2002; 353: 163-171.

Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* 2000; 82: 33-41.

Zamunér SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon* 2001; 39: 1505-1513.

Zhang W, Contag PR, Hardy J, Zhao H, Vreman HJ, Hajdena-Dawson M, Wong RJ, Stevenson DK, Contag CH. Selection of potential therapeutics based on *in vivo* spatiotemporal transcription patterns of heme oxygenase-1. *J Mol Med* 2002; 80: 655-664.