

Valéria Barbosa de Souza

Mediação da Osteopontina na mionecrose e
regeneração muscular após envenenamento
por *Bothrops lanceolatus*

CAMPINAS

2011

Valéria Barbosa de Souza

Mediação da Osteopontina na mionecrose e
regeneração muscular após envenenamento
por *Bothrops lanceolatus*

Tese de mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas-UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Co-orientadora: Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo

CAMPINAS

2011

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

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

B234m Barbosa-Souza, Valéria
 Mediação da osteopontina na mionecrose e regeneração muscular
 após envenenamento por *Bothrops lanceolatus* / Valéria Barbosa de
 Souza. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Maria Alice da Cruz-Höfling
Co-orientador: Albetiza Lôbo de Araújo
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bothrops. 2. Lesão muscular. 3. Músculo esquelético. 4.
Regeneração muscular. 5. Matriz extracelular. 6. Degeneração. I.
Cruz-Höfling, Maria Alice da. II. Araújo, Albetiza Lôbo de. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês: Osteopontin mediation on myonecrosis and muscle
regeneration after *Bothrops lanceolatus* snake envenoming**

Keywords: • Bothrops
 • Muscle injury
 • Skeletal muscle
 • Muscle regeneration
 • Extracellular matrix
 • Degeneration

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Maria Alice da Cruz-Höfling
Prof. Dr. Elen Cristina Teizem Landucci
Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro**

Data da defesa: 15-03-2011

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Valéria Barbosa de Souza

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Maria Alice Da Cruz Hofling

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Maria Alice Da Cruz Hofling	
Professor (a) Doutor (a) Elen Cristina Teizem Landucci	
Professor (a) Doutor (a) Paulo Pinto Joazeiro	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/03/2011

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos e Vanda,
pela dedicação e pela minha formação pessoal e educacional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais em especial,

A Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling, pela contribuição com seu conhecimento científico.

A Profa. Dra. Sílvia Irazusta Pierre, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

A todos os técnicos do Departamento de Histologia do Instituto de Biologia pela amizade e auxílio nos momentos de dificuldades, em especial Marta Beatriz Leonardo e Célia Garcia.

Aos professores e alunos da pós-graduação do Departamento de Histologia do Instituto de Biologia da Unicamp que me auxiliaram e que de alguma forma contribuíram para a realização do projeto.

A Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pela amizade antes e durante o mestrado.

Ao amigo Daniel Kiss Contin pelo grande auxílio no início do mestrado, e pela amizade.

Aos amigos Philipi Coutinho, Cristielle Freitas e Sandro Rostelato pela amizade e momentos de alegria.

Ao laboratório de Anatomia Patológica, em especial a Dra. Glauce Aparecida Pinto.

Aos docentes do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Unicamp, pela contribuição em minha formação científica.

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

A CAPES, pelo apoio financeiro que recebi durante os dois anos para conclusão do mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Erika Maria Silva Freitas e a profa. Dra. Doroty M. Dourado pela amizade e troca de conhecimentos.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e pelos momentos de alegria.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	Xiii
ABSTRACT	Xvi
1 – INTRODUÇÃO.....	19
1.1 - Toxinas Ofídicas e Lesões Musculares.....	20
1.1.1 - Enzimas fosfolipase A ₂	20
1.1.2 - Metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMPs).....	22
1.2 - Células inflamatórias: neutrófilos e macrófagos.....	24
1.3 - A Toxinologia de <i>Bothrops lanceolatus</i>	26
1.4 - Regeneração Muscular.....	28
1.4.1- Células satélites e Fatores Regulatórios Miogênicos.....	29
1.4.2- Componentes da Matriz Extracelular e Fibrose.....	32
1.5 – Osteopontina.....	34
2 – OBJETIVOS.....	38
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 – Veneno.....	41
3.2 - Animais.....	41
3.3 - Tratamento com o veneno.....	41
3.4 - Processamento do músculo.....	42
3.5 - Cortes Histológicos.....	42
3.6 - Medida do Diâmetro da Fibra Muscular.....	42
3.7 - Imunohistoquímica.....	43

3.8 – Dupla marcação.....	45
3.9 - Análise e Quantificação das Imagens.....	45
3.10 - Análise Estatística.....	46
4 - RESULTADOS.....	47
4.1 - Análise Histológica.....	48
4.2 - Morfometria: Diâmetro da Fibra Muscular.....	52
4.3 - Imunohistoquímica.....	54
5 – DISCUSSÃO.....	62
6 – CONCLUSÃO.....	73
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8-ANEXOS.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
bHLH	proteínas básicas hélix-loop-hélix (basic helix-loop-helix)
VBL	veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>
COX	ciclo-oxigenase
DAB	diaminobenzidina
FGF	fator de crescimento de fibroblasto (Fibroblast growth factor)
IFN-γ	interferon gama
IGF	fator de crescimento tipo insulina (Insulin growth factor)
IL	interleucina
LAO	L-amino ácido oxidase
LDLs	lipoproteínas de baixa densidade
MEC	matriz extracelular
MMPs	metaloproteinases
MPO	mieloperoxidase
MRFs	fatores regulatórios miogênicos (myogenic regulatory factors)
NO	óxido nítrico (nitric oxide)
OPN	osteopontina
PBS	tampão fosfato salina (phosphate buffer-saline)
PLA₂	fosfolipase A ₂ (phospholipase A ₂)
PGE₂	prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGI₂	prostaciclina

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SVMP	metaloproteinases de veneno de serpente
TGF-β	fator de crescimento de transformação β
TIMP	inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF-α	fator alfa de necrose tumoral

LISTA DE TABELAS

PÁG.

Tabela 1. Marcadores imunofenotípicos utilizados para identificação das células estudadas.....	44
--	----

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Esquema de localização de célula satélite na fibra muscular.....	30
Figura 2. Esquema de regeneração muscular após qualquer tipo de lesão.....	31
Figura 3. Análise histológica do músculo gastrocnemius de ratos após injeção i.m. de veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	50
Figura 4. Análise histológica do músculo gastrocnêmio de ratos após injeção i.m. de veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> utilizando a coloração Tricrômico Masson.....	51
Figura 5. Medida do diâmetro da fibra muscular.....	53
Figura 6. Expressão por imunohistoquímica do receptor transmembrana CD68 de macrófagos residentes no músculo gastrocnêmio de ratos.....	55
Figura 7. Dupla marcação de OPN/CD68 em gastrocnêmio de ratos após 3 dias de injeção de veneno de <i>B. lanceolatus</i>	56
Figura 8. Expressão por imunohistoquímica de OPN no músculo gastrocnêmio de ratos.....	58
Figura 9. Imunomarcação de OPN em miofibras, mioblastos, miotubos, macrófagos e fibroblastos 7 dias após injeção de BLV.....	59
Figura 10. Expressão por imunohistoquímica de miogenina no músculo gastrocnêmio de ratos.....	61
Figura 11. Cronologia da expressão da OPN em modelo de regeneração muscular após injeção de veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> (VBL).....	72

Os acidentes por serpentes venenosas podem causar alterações locais graves e de rápido desenvolvimento. O veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) contém, dentre outras toxinas, metaloproteinases hemorrágicas e pouco hemorrágicas (SVMPI e SVMPIII) e atividade pró-trombina que causam inflamação (vias das ciclooxigenases-COX e lipoxigenases), alterações hemostáticas e degenerativas. O veneno de *Bothrops lanceolatus* (100 µg/100 µl) foi injetado no gastrocnêmio de ratos para investigar a patogênese da mionecrose (1,3,6,18 horas, 1, 2 dias) e regeneração muscular (3,7,14 e 21 dias) ocasionada pelo envenenamento através de análise histológica quantitativa (medida do menor diâmetro 1 hora e 21 dias pós-VBL) e imunohistoquímica para a osteopontina (OPN), citocina inflamatória, quimiotática, com sítios de ligação para integrinas de matriz e células. A medida da expressão dos macrófagos residentes (CD68+) e dos macrófagos migrantes (CD163+), de myoD e miogenina, membros da família de fatores transcricionais miogênicos foi feita com o objetivo de correlacionar com a expressão da OPN nos diferentes estágios patológicos (n=6/período) ao longo do período experimental. Os grupos controles foram injetados com PBS (100 µl). O envenenamento produziu hemorragia local, edema, infiltrado neutrofílico e macrófágico e desorganização das bainhas perimisiais de tecido conjuntivo, após 48 horas. As fibras mionecróticas apresentavam-se em número moderado. Aos 3 dias, havia focos de deposição de colágeno (tipo I) no meio dos quais se viam mioblastos. O número de macrófagos CD68+ atingiu o máximo às 24 horas, e manteve-se significativamente maior que nos grupos controles até aos sete dias. A expressão de OPN foi significativamente maior das 6 horas aos 3 dias e dos 7 aos 14 dias, sendo expressa em fibras musculares, macrófagos, mioblastos, miotubos e fibroblastos. Não foi obtida

marcação para anti-myod; a expressão de miogenina, que tipicamente é nuclear, foi observada também no citoplasma de mioblastos e miotubos até o 7^o dia (pico), sendo sua expressão somente nuclear aos 14 dias. A retenção de miogenina no citoplasma tem sido interpretada como mecanismo de retardo na diferenciação, já que a presença no núcleo é necessária para o seu papel regulador transcricional. Aos 21 dias as fibras regeneradas, com núcleo central, não haviam atingido o tamanho das fibras maduras intactas (VBL) e dos controles. Considerando que as SVMs e a enzima com atividade tipo trombina de VBL, podem aumentar a capacidade de ligação de sítios da OPN a integrinas de matriz e de superfícies de células, sugerimos que durante a patogênese da regeneração muscular post-VBL a OPN estaria criticamente envolvida no processo inflamatório agudo, e como tal atuaria primordialmente como citocina ativadora de células satélites quiescentes, seguida por atividade quimiotática e adesiva, favorecendo migração, proliferação de mioblastos e a diferenciação de miotubos. Segundo a literatura a OPN é profibrótica em certas doenças. Sugerimos que a fibrose intersticial observada, mais a presença tardia de macrófagos no local, mais a expressão citoplasmática da miogenina podem ter sido fatores relevantes que levaram ao atraso da regeneração das fibras musculares, como constatado pelo tamanho menor diâmetro das fibras. Sugere-se para a OPN um papel dual, isto é, tanto pró-regenerativo, como anti-regenerativo na patogênese das alterações causadas pelo veneno de *B. lanceolatus*.

Abstract

Accidents caused by venomous snakes can lead to local changes of serious and rapid development. *Bothrops lanceolatus* venom (BLV) contains, among other toxins, hemorrhagic metalloproteinases and non-hemorrhagic (SVMPI and SVMPIII) and prothrombin activity. As result, the venom causes hemostatic and inflammatory (via lipoxigenase and cyclooxygenase) and degenerative alterations. In this study, *Bothrops lanceolatus* venom (100 µg/100µl) was injected into the gastrocnemius of rats to investigate the pathogenesis of myonecrosis (one, three, six, 18 hours and two days) and regeneration (three, seven, 14 and 21 days) by quantitative histological analysis (measurement of the small diameter one hour and 21 days post-BLV injection) and immunohistochemistry for osteopontin (OPN) protein, an inflammatory and chemotactic cytokines, with integrin binding sites to matrix proteins and cells. The number of macrophages CD68+ (resident macrophages), and CD163 (migrants macrophages), the expression of myoD and myogenin, members of the myogenic, both transcription factors family were correlated (n = 6/period). Control groups were injected with PBS (100µl). The envenomation produced local hemorrhage (initially massive), acute interstitial edema and myofibers, neutrophil and macrophage infiltration, and disruption of the perimysium sheath of connective tissue. These changes were observed up to 48 hours. The number of myonecrotic fibers was in moderate number. At 3 days, there were foci of collagen (type I) deposition surrounding groups of myoblasts. The number of macrophages (CD68 +) peaked at 24 hours, and remained significantly higher for seven days: there was no expression of CD163 macrophages. The OPN expression showed two steps, a significant increase in, from six hours to three days and

Abstract

from seven to 14 days, and it was expressed in muscle fibers, macrophages, myoblasts, myotubes and fibroblasts. There was no MyoD immunolabeling. The myogenin expression, which is known to be typically nuclear, was also observed in the cytoplasm of myoblasts and myotubes until 7 days (peak). At 14 days, the myogenin expression became nuclear. The cytoplasmic retention of myogenin has been interpreted as a mechanism to delay myotube differentiation, since the presence in the nucleus is required for its transcriptional regulatory role. At 21 days, the regenerated fibers with central nucleus had not reached the size of intact fibers (VBL), nor that of controls. Whereas SVMPs and an enzyme with thrombin-like activity are known to increase the capacity of OPN binding to integrin of matrix and cell surfaces, we suggest that, during the pathogenesis of muscle regeneration post-VBL injection, OPN would be critically involved in an acute inflammatory process. OPN would act primarily as a cytokine activator of quiescent satellite cells and later play chemotactic and adhesive activities, promoting migration, proliferation of myoblasts, and formation and differentiation of myotubes. According to the literature, OPN is profibrotic in certain diseases. We suggest that the foci of interstitial fibrosis and the late presence of macrophages at the site of regeneration, as well as the cytoplasmic expression of myogenin may be relevant factors that lead to regeneration delay. It is suggested a pro-regenerative and anti-regenerative roles for OPN in the pathogenesis of alterations caused by *B. lanceolatus* venom.

1. Introdução

1.1 - Toxinas ofídicas e sua ação no músculo esquelético

A alterações mionecróticas do músculo esquelético provocada por venenos de serpentes têm sido estudadas experimentalmente, bem como esforços tem sido feitos no sentido de procurar implementar a regeneração da região afetada (1,2,3,4,5). Os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são caracterizados por lesões locais proeminentes, principalmente devido à hemorragia, mionecrose, inflamação, formação de edema, (6,7,8) e também por alterações sistêmicas como distúrbios na coagulação, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda (6,9,10). Muitos dos efeitos locais e sistêmicos induzidos por venenos da família Viperidae são primariamente consequência da ação das metaloproteinases dependentes de zinco (SVMPs) e/ou das fosfolipases A₂ (PLA₂) (11).

1.1.1 - Enzimas Fosfolipases A₂

As PLA₂ de veneno são responsáveis por uma variedade de efeitos farmacológicos que incluem miotoxicidade, neurotoxicidade, interferência na agregação plaquetária, citotoxicidade, efeitos anticoagulantes e inflamatórios (12). Estas toxinas compreendem uma família de hidrolases esterolíticas que catalizam a hidrólise de fosfoglicerídeos 3-sn na posição 2, gerando ácidos graxos livres. As PLA₂ dos venenos de serpentes apresentam baixa massa molecular (~14kD); foram classificadas em dois grupos tendo como base suas estruturas primárias e a ligação de pontes dissulfeto. O grupo I inclui a família Elapidae e o grupo II, inclui a Viperidae. As miotoxinas PLA₂ que estão presentes nos venenos das

serpentes podem ser subdivididas em dois tipos: as cataliticamente ativas (PLA₂-Asp-49) e aquelas que podem apresentar pouca ou nenhuma atividade enzimática (PLA₂-Lys-49 ou PLA₂-“like”). As Asp-49 são as enzimas que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 da cadeia de aminoácidos que é o sítio de ligação ao cálcio (12,13) e inclui, por exemplo, a miotoxina I do veneno de *B. asper* (3). As Lys-49 são aquelas que apresentam um resíduo lisina na posição 49 e possuem pouca ou nenhuma atividade fosfolipolítica. Este grupo pode ser representado, por exemplo, pela mitoxina II de *B. asper* (14), a bothropstoxina I de *B. jararacussu* (15) e a miotoxina II de *B. godmani* (16).

Brenes e colaboradores (17) consideraram que as miotoxinas botrópicas lesam a membrana plasmática da célula muscular, como passo fundamental para a necrose. Uma vez que existem miotoxinas que não possuem atividade de fosfolipase A₂, essa alteração da membrana não depende necessariamente da hidrólise de fosfolipídios e, possivelmente, seja consequência da ação de um domínio molecular das toxinas, capaz de penetrar e desorganizar a bicamada lipídica (18). No caso da miotoxina II do veneno de *B. asper*, uma Lys-49, sugere-se que esta região molecular seja uma porção ligada à extremidade carboxila terminal da toxina (19). Por outro lado, para as miotoxinas que apresentam atividade catalítica, isto é, as Asp-49, sugere-se que a atividade enzimática contribua para aumentar a alteração da membrana, já que a inibição da atividade enzimática reduz a extensão da necrose muscular (17,18,19).

O evento central na patogênese do dano celular, em ambos os casos, constitui-se na entrada maciça de íons cálcio que gera uma enorme quantidade de alterações celulares,

entre elas: 1) hipercontração de miofilamentos, com perda do alinhamento das miofibrilas, 2) alterações mitocondriais, 3) alterações metabólicas, 4) ativação de enzimas proteolíticas endógenas dependentes de cálcio, e 5) ativação de fosfolipase A₂ endógena, dentre outras (20). Estes efeitos desencadeiam uma reação inflamatória com a presença de intenso infiltrado de células fagocíticas (2,21,22). Estas células são responsáveis pela remoção do tecido necrótico, passo necessário ao processo de regeneração muscular (23,24).

1.1.2 - Metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMPs)

Além da lesão muscular causada pelas miotoxinas, os venenos de serpentes, como as da família Viperidae, também parecem induzir necrose muscular como consequência da isquemia que se desencadeia no tecido, e que é produto das sérias alterações vasculares como hemorragia, trombose e lesões da parede vascular (25).

As metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMPs) são responsáveis pelos efeitos hemorrágicos característicos dos envenenamentos causados pelas serpentes da família Viperidae (26,27). AS SVMPS são membros da subfamília das enzimas chamadas de reprotinas (metaloproteinases dependente de zinco) que também inclui um grupo de proteínas homólogas de mamíferos, uma desintegrina e uma metaloproteinase (ADAM) (28). Por sua vez, as SVMPs são parte da família da “metzincina” de metaloproteinases dependentes de zinco que juntamente com as metaloproteinases de matriz (MMPs), as astacinas e as serralisinas, exibem uma sequência consenso de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH, e a presença de “methionin-turn”) (29).

A classificação das metaloproteinases presentes no veneno de serpentes é baseada na massa molecular e nos domínios estruturais, sendo quatro as classes conhecidas (30): - P-I: compreende as metaloproteinases que possuem somente o domínio catalítico. – P-II: as metaloproteinases que apresentam o domínio catalítico seguido por um domínio de desintegrina – P-III: são as metaloproteinases constituídas pelo domínio catalítico, domínio desintegrina e o domínio rico em cisteína. – P-IV: compreende um grupo de enzimas que possuem, além dos três domínios descritos na classe das P-III, um polipeptídeo tipo lectina, ligado por uma ponte dissulfeto à cadeia polipeptídica da metaloproteinase (28, 31). Sugere-se que as diferenças na estrutura dos domínios das SVMPs contribuem para sua ação diferencial sobre os vasos sanguíneos (31). As SVMPs induzem hemorragia por afetar diretamente a maioria dos vasos sanguíneos. Estas enzimas podem clivar regiões altamente seletivas e/ou peptídeos chaves dos componentes da membrana basal, podendo afetar a interação entre a membrana basal e as células endoteliais. Consequentemente, tais células são submetidas a uma série de alterações morfológicas e funcionais *in vivo*, provavelmente associadas a fatores biofísicos e hemodinâmicos. No final, são formadas as interrupções na parede endotelial através das quais ocorre o extravasamento de fluídos e células sanguíneas (7,32).

Foi demonstrado que as alterações mionécroticas ocorrem logo após a injeção de SVMPs isoladas do veneno de *B. asper*, em camundongos (33,34). Gutiérrez et al. (34) propuseram que a mionecrose ocorre como consequência do sangramento e da perfusão reduzida do tecido. Uma vez que a presença de vasculatura intacta e adequada perfusão constituem um dos requisitos para que ocorra regeneração muscular, parece claro que a

ação das toxinas hemorrágicas afeta drasticamente a regeneração muscular, tal como observado com a SVMP BaH1 do veneno de *B. asper*. No processo de regeneração, após a lesão causada pelo veneno de *B. asper*, duas populações de fibras foram observadas: uma delas aparentemente normal, situada em áreas de abundante renovação da microcirculação e, outra, onde as fibras com sinais de degeneração e presença de fibrose coincidem com áreas de escassa reconstituição da vascularização. Estas fibras apresentaram-se com tamanho reduzido e nucleadas centralmente ao final do período de quatro semanas indicando que a regeneração não foi completa (33).

As SVMPs também participam na degradação de componentes da matriz extracelular e desempenham importante papel na resposta inflamatória local que caracteriza o envenenamento por serpentes. Estas enzimas induzem também o edema, a ativação de metaloproteinases endógenas (MMPs) (7, 35,36) e a infiltração de células inflamatórias para a área de lesão (35).

1.2 - Células inflamatórias: Neutrófilos e Macrófagos

A presença de neutrófilos no local da lesão produz danos na membrana muscular devido à liberação de mieloperoxidases (MPO) que ativa a capacidade citolítica de macrófagos para lisar células musculares (37). Os primeiros macrófagos que infiltram na área de lesão do músculo esquelético são aqueles que possuem fenótipo fagocítico (38). Chazaud e colaboradores (39) revelaram que estas células desempenham dupla função dentro do processo de regeneração muscular. A primeira função é a fagocitose dos restos necróticos, ao mesmo tempo em que liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de

crescimento (fase inflamatória), capazes de ativar as células satélites. A outra função seria a liberação de citocinas antiinflamatórias contribuindo, agora, para a diferenciação miogênica e o reparo tecidual.

Outros estudos propuseram que os macrófagos com função pró-inflamatória são as populações residentes com fenótipo M1 e que expressam a proteína transmembrana CD68. Os macrófagos M1 além da atividade fagocítica podem ainda contribuir para a exacerbação da inflamação, produzindo e liberando várias substâncias, incluindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e prostaglandina E₂ (PGE₂) (40,41). No caso de mionecrose por envenenamento botrópico, pesquisas têm sido realizadas no sentido de elucidar a participação das mesmas na patogênese das alterações musculares.

Experimentos realizados com a fosfolipase A₂ miotóxica (miotoxina III) e a SVMP (BaPI), isoladas do veneno da *B. asper*, mostraram elevação dos níveis das interleucinas IL-1 β , IL-6, mas não do TNF- α e IFN- γ (35). Rucavado e colaboradores (35) revelaram que a patologia tecidual local induzida pelo veneno de *B. asper*, e provavelmente, por outros venenos de serpentes, deve-se, ao fato de que as citocinas IL-1 β e IL-6 são produzidas por um número diferente de tipos celulares, como os macrófagos e as células endoteliais, enquanto que, o TNF- α é produzido principalmente por macrófagos residentes. Estes macrófagos (população M1) estão presentes no músculo esquelético em condições normais. *In vitro*, a miotoxina III e a BaPI não induziram a síntese de TNF- α por macrófagos residentes. Embora, os níveis de TNF- α e IFN- γ não foram significativamente elevados, foi sugerido que as citocinas desempenham papel relevante na fisiopatologia destes acidentes ofídicos em vítimas humanas (35). Chaves et al (36) sugeriram que a liberação local das

citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ têm participação na reação inflamatória através de sinais para que ocorra remoção do material necrótico pelas células inflamatórias tornando possível o reparo tecidual e a revascularização.

Ainda durante a fase inflamatória após os macrófagos M1 atingirem o pico no músculo lesado, eles são substituídos por uma população de macrófagos M2 que podem atenuar a resposta inflamatória contribuindo para que aconteça o reparo tecidual (42). Existem três subpopulações de macrófagos M2, cada qual possui especializações funcionais e moleculares específicas (43). Genericamente, os macrófagos M2 que expressam a proteína transmembrana CD163 (44) podem ser ativados por complexos imunes que induzem a liberação de citocinas antiinflamatórias como a IL-10 com função de inibir a atividade de M1 promovendo, assim, a proliferação celular (43). Os macrófagos M2 são ativados por citocinas como IL-4, a IL-10 e a IL-13 (37,41). Estes são processos que estão estreitamente ligados a regeneração muscular subsequente como verá no item 1.4. Regeneração muscular.

1.3 - A toxinologia de *Bothrops lanceolatus*

A serpente *Bothrops lanceolatus* é uma espécie que habita as regiões úmidas da Ilha da Martinica, no Caribe. O seu veneno é considerado como tendo baixa miotoxidade. Entretanto, induz eventos trombóticos em vítimas humanas (5,45,46), os quais não são reproduzidos em camundongos (5). Em humanos, as SVMPs são as prováveis causadoras dos danos endoteliais acarretando as complicações trombóticas, especialmente representadas pelos infartos cerebrais e de miocárdio, os quais ocorrem geralmente, dentro

de 7 h a 1 semana após a picada em 30-40% dos pacientes envenenados (5). Acredita-se que tal mecanismo de início tardio, se deva a presença de ativadores do fator de Von Willebrand ou de componentes do tipo Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) presentes no veneno (5,46). Apesar destas considerações, a análise proteômica não revelou a presença destes componentes no veneno de *B. lanceolatus* (5).

A composição do veneno de *B. lanceolatus* inclui as metaloproteinases hemorrágicas dependente de zinco (SVMPs), L-amino ácido oxidase (LAO), serina proteases e fosfolipase A₂ (PLA₂) (5,47,48,49). Algumas das enzimas responsáveis por estas atividades já foram isoladas, como a PLA₂ ácida, que possui ação anticoagulante (49). Esta enzima possui similaridades químicas com outras fosfolipases ácidas e apresenta massa molecular em torno de 15kDa (50).

Lôbo de Araújo (50) demonstrou que a PLA₂ do veneno de *B. lanceolatus* mesmo sendo capaz de evocar sinais de envenenamento, é muito menos tóxica quando comparada com o veneno total, e, portanto a proteína não é capaz de causar sozinha a letalidade. Também esta PLA₂ não bloqueia a neurotransmissão em preparações biventer cervis de pintainhos. Lôbo de Araújo e colaboradores (51) constataram que uma proteína com atividade caseinolítica de aproximadamente 27.5 kDa purificada do veneno é que foi capaz de induzir o bloqueio neuromuscular.

O veneno de *B. lanceolatus* apresenta também uma enzima com atividade tipo trombina capaz de coagular o fibrinogênio e formar fibrina (52,53). Outra fração protéica de 28 kDa, isolada deste veneno foi identificada como uma metaloproteinase hemorrágica,

denominada BlaH1, cujas atividades enzimáticas assemelham-se às de outras hemorraginas isoladas de venenos botrópicos (47).

Estas metaloproteinases dependentes de zinco podem romper a integridade do endotélio vascular causando extravasamento de fluídos e células sangüíneas. As propriedades da BlaH1 isolada do veneno de *B. lanceolatus* indicam que provavelmente esta enzima pertença a classe P-I (47). Outra metaloproteinase que compõe o veneno desta espécie é a de classe P-III. Esta enzima foi caracterizada por análise proteômica e descrita como tendo baixo potencial hemorrágico (5, 54). Poucas SVMP da classe PIII com baixo ou nenhuma atividade hemorrágica foram isoladas e caracterizadas dos venenos de *Bothrops sp* (54,55) como em *B. neuwiedi* e *B. erythromelas* (56,57).

O veneno de *B. lanceolatus*, quando injetado em patas de camundongos, produz edema, acompanhado de infiltrado leucocitário (9). Em ratos, o tratamento físico a (97°C por 30 segundos) (58), ou químico (EDTA) (59) do veneno, reduz o edema e a hemorragia da pata. Em ambos os casos, o edema ocorre com a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, pela via da lipoxigenase e ciclooxigenase, bem como, de histamina, bradicinina, e serotonina (59). Ainda em relação ao processo inflamatório, o veneno da *B. lanceolatus* induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, corroborando quanto à participação destas vias no processo inflamatório (60).

1.4 - Regeneração Muscular

A inflamação é um componente crítico da fisiologia muscular sendo uma fase importante para a regeneração do músculo esquelético, pois envolve macrófagos, o fator de

crescimento de transformação β (TGF- β) e metabólitos da via da ciclooxygenase (COX₂) (61). Logo após a lesão muscular, neutrófilos e macrófagos são ativados rapidamente para o local em resposta aos sinais inflamatórios (62). Os neutrófilos são os primeiros a se infiltrarem e liberarem radicais livres de oxigênio e proteases que degradam restos necróticos gerados durante a lesão, mas, ao mesmo tempo causam danos adicionais ao tecido (62,63). Em seguida, os macrófagos assumem seu principal papel que é fagocitar os restos necróticos. (38,64). Assim, em resposta à lesão muscular, vias celulares distintas são ativadas para o reparo do tecido danificado. A ativação ou restrição de algumas destas vias pode ser temporariamente coordenada em uma seqüência precisa com a progressão da regeneração, se a integridade muscular e a homeostase forem restauradas. Entretanto, se a lesão persistir, como na distrofia muscular, o processo de reparo torna-se incontrolável sendo conduzido para a substituição das miofibras por uma massa não funcional de tecido fibrótico (65).

1.4.1 - Células satélites e Fatores Regulatórios Miogênicos

Durante o processo inflamatório do músculo esquelético, as citocinas e os fatores de crescimento secretados pelas células inflamatórias ativam as células satélites que proliferam e se diferenciam com vistas ao reparo da fibra muscular (65,66,67).

As células satélites são populações de células-tronco latentes, mononucleadas que estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática (sarcolema) da fibra muscular (68,69,70). Estas células estão normalmente quiescentes no músculo adulto e podem ser ativadas em resposta à lesão, estímulos tóxicos e não tóxicos, estímulos

Introdução

hormonais ou mecânicos. As células satélites quiescentes expressam Pax7 (marcador molecular de células satélites) (71) e moléculas de adesão N-CAM e M-caderina (72,73).

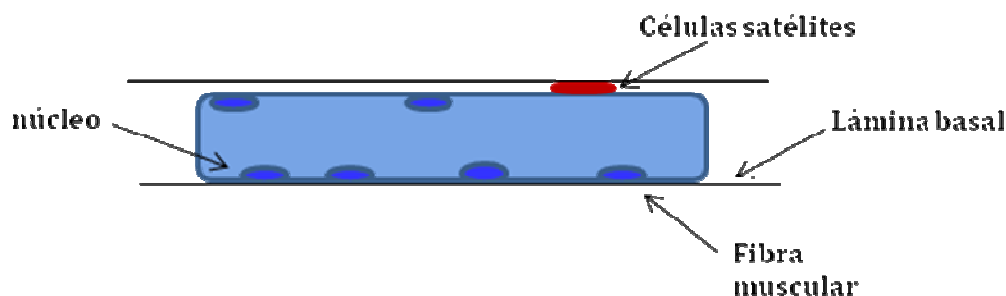


Figura 1. Esquema de localização da célula satélite na fibra muscular

Fonte: www.babraham.ac.uk

Uma vez ativadas, as células satélites são capazes de migração para o local da lesão, proliferação e diferenciação. A ativação de tais células induz a expressão dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) Myf5 e MyoD e a atividade mitótica (41,71). Após dividirem-se e proliferarem, as células satélites diferenciam-se em miotubos, os quais sofrem a ação dos fatores de crescimento como fator de crescimento tipo insulina (IGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (74). O estágio de diferenciação dos mioblastos coincide com a expressão negativa do Pax7 (75) e também com a superexpressão de miogenina e Mrf4 (71,76). Um *pool* de mioblastos formado se funde uns aos outros ou em fibras musculares pré-existent (que podem ter sofrido danos) dando origem a miotubos multinucleados (cujos núcleos estão localizados centralmente) para substituir a fibra necrótica ou reparar a fibra danificada ou aumentar o tamanho da fibra muscular após exercício (74,76,77).

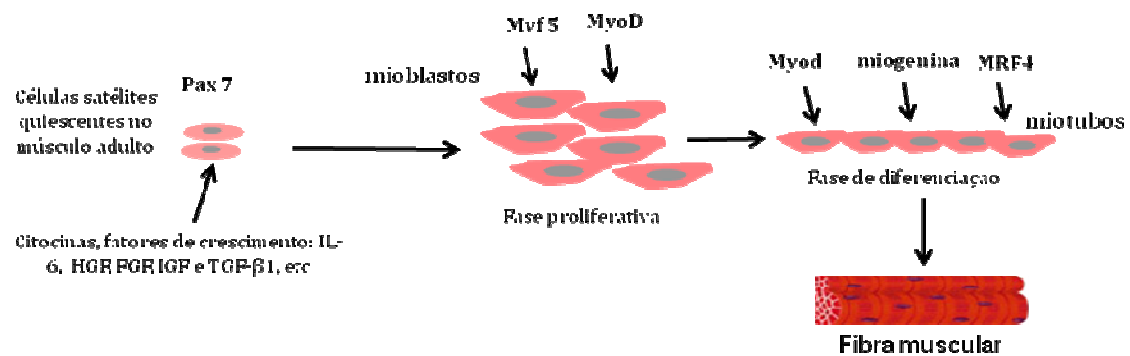


Figura 2. Esquema de regeneração muscular após estímulos.

Os Fatores Regulatórios Miogênicos (MRF) são membros de uma família de proteínas básicas hélice-alça-hélice (bHLH) que agem como ativadores transcricionais de genes específicos do músculo (78,79). A MyoD e a Myf5 estão envolvidas na ativação das células satélites e na regulação da proliferação de mioblastos, enquanto que, a miogenina e a Mrf4 regulam o programa de diferenciação terminal dos mioblastos em miotubos (80,81).

O sucesso do crescimento e reparo do músculo esquelético pelas células satélites depende de forma crucial das citocinas e dos fatores de crescimento como fator de necrose tumoral α (TNF- α), fatores de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF), fator de crescimento de transformação β (TGF- β) (81,82). Estes fatores de crescimento interagem inicialmente com receptores específicos na superfície celular, como por exemplo, os receptores das células satélites, desencadeando um ou mais processos de sinalização intracelular (82).

Estudos relatam que o FGF faz com que os mioblastos deixem a fase G_0 do ciclo celular e atinjam a fase G_1 . A estimulação da diferenciação é feita pelos IGF-I e IGF-II.

Os fatores FGF e IGF estimulam a proliferação de mioblastos e o TGF- β suprime a proliferação dos mesmos (82). Os fatores FGF, IGF-1 e TGF- β 1 recrutam e ativam fibroblastos que eventualmente secretam moléculas da matriz como o colágeno para começar o processo de reparo (83). Durante o reparo tecidual, os fibroblastos continuam a secretar suas próprias citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1, e também a recrutar neutrófilos adicionais através da produção de IL-8 (84). Embora estudos revelem que a proliferação de células satélites é acentuada na presença de macrófagos, a liberação excessiva de quantidades de TGF- β 1 inibe a diferenciação celular podendo comprometer a regeneração da fibra (85).

1.4.2 - Componentes da Matriz Extracelular e Fibrose

As células satélites usam a membrana basal das fibras necróticas como uma estrutura de ancoragem para garantir que novas fibras mantenham uma posição similar. Para que o reparo muscular ocorra também é necessária a migração e a proliferação dos fibroblastos, um dos componentes da matriz extracelular (MEC) (65). Os fibroblastos quando ativados sintetizam uma ampla variedade de fatores de crescimento e componentes da MEC incluindo proteínas que se ligam aos receptores de integrinas tais como a fibronectina (86), colágeno tipo I, III e proteoglicanos (87) que ordenadamente contribuem para promover proliferação celular e migração, além da expansão do tecido conjuntivo e deposição de nova matriz para o endomísio (65).

A MEC é uma associação de tipos de colágenos, glicoproteínas não colagênicas e proteoglicanos que circundam as células, entre as quais, a fibra muscular constituindo o

endomísio (88). A MEC pode ser degradada por metaloproteinases de matriz dependentes de metais, principalmente zinco e cálcio. A atividade das metaloproteinases de matriz no espaço extracelular pode ser inibida especificamente por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) (89,90). A expressão dos genes das metaloproteinases é regulada por citocinas, fatores de crescimento e pelo contato da célula com a MEC. A degradação da MEC pode ocorrer normalmente durante o desenvolvimento, o crescimento e também no reparo tecidual (88). Embora, inicialmente seja benéfico, o processo de deposição da matriz quando excessivo pode se tornar patológico, resultando em remodelamento substancial da lâmina basal da fibra muscular e a formação de tecido fibrótico constituído por colágeno, decorrente da produção e acumulação de componentes intersticiais da MEC (ácido hialurônico, fibronectina, proteoglicanos e colágeno intersticial) (65). A fibrose pode ocorrer quando o fibroblasto sintetiza excessivamente a fibronectina, os proteoglicanos, os colágenos tipos I e III, ou quando o equilíbrio entre TIMPs e MMPs se desloca a favor das TIMPs (91).

Ainda que o processo de regeneração tecidual dependa da amplitude e da natureza da lesão ou de estímulos (físicos ou químicos), em qualquer destas situações; o processo envolve a revascularização, a infiltração de células inflamatórias, fagocitose de restos celulares, a ativação, a proliferação e a fusão das células satélites para a formação de mioblastos, com posterior diferenciação em miotubos para formação da nova fibra muscular ou reparo de fibras pré-existentes. Para o sucesso total da regeneração, deve haver revascularização, reinervação e recuperação completa da função muscular (79,92). A integridade da lâmina basal, componente do endomísio que está relacionada intimamente

com a membrana da fibra muscular, também se faz importante no sucesso da regeneração, sobretudo, para a formação e orientação espacial dos novos miotubos e desenvolvimento mínimo de fibrose (93). Ferrari et al. (93) sugerem que o tempo de reparo do músculo, por exemplo, após exercício depende da integridade da lâmina basal, podendo ocorrer a regeneração completa em sete dias, enquanto que, se for destruída extensamente, o processo pode alcançar até vinte e um dias. Gutiérrez e colaboradores (4) utilizaram a toxina bothropstoxin II (BthTX-II) isolada do veneno de *B. jararacussu* para os estudos de regeneração muscular em camundongos, onde observaram que aos 28 dias, as fibras regeneradas tinham o diâmetro similar aos das fibras musculares adultas. Os autores sugeriram que a regeneração muscular foi completa porque a toxina não afetou a lâmina basal, vasos sanguíneos e nem as fibras nervosas.

1.5 - Osteopontina

A osteopontina (OPN) é uma fosfoproteína *O*-glicosilada com aproximadamente 35 a 60 kD, sintetizada em uma variedade de células e tecidos. Foi originalmente identificada como proteína da matriz óssea, e subsequentemente, evidenciada como citocina Eta-1 produzida por células T ativadas (86,94,95). No sistema imune, a OPN é secretada por diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, e linfócitos B e T (86). Células como fibroblastos (96), a maioria das células tumorais (97,98) e as células endoteliais (99) também expressam OPN. Esta glicoproteína tem sido identificada no fígado, rim, pulmão, e nos tecidos ósseo, nervoso e adiposo, além do trato gastrointestinal (86,100). A OPN participa de uma série de processos fisiológicos, como

síntese de fibrilas colágenas, angiogênese, migração de células e cicatrização (86). Além disso, desempenha papel relevante em vários eventos fisiopatológicos (101). A diversidade de funções e a expressão por diferentes células em diferentes tecidos, órgãos e sistemas, e estados fisiológicos e patológicos são provas do caráter pleiotrópico desta proteína (86).

Hirata et al (102) estudaram a regeneração muscular após injeção i.m. de cardiotoxina do veneno de *Naja naja atra*. Os autores demonstraram elevação significativa da expressão de genes codificadores de quimiocinas e de seus receptores, até sete dias após a injeção da cardiotoxina. Entre as proteínas, a OPN, conhecida como um importante regulador da inflamação estava marcadamente elevada. Sua expressão no citoplasma de macrófagos foi confirmada por imunohistoquímica, sugerindo que a osteopontina participe como molécula de adesão de macrófagos na fibra necrótica. Estudos anteriores já haviam demonstrado a elevação da expressão de OPN por macrófagos, em resposta a lesão no músculo cardíaco, bem como sua redução drástica durante o processo regenerativo (103). Estes resultados são considerados a primeira evidência de que a OPN pode ser importante na regeneração muscular após ação de toxina de serpente estando possivelmente envolvida nos processos de adesão celular, quimiotaxia e/ou fagocitose (102).

Estudos clínicos demonstraram que os níveis elevados de OPN no plasma estão associados com alguns tipos de doenças caracterizadas por inflamação crônica como a doença de Crohn (104), encefalites autoimune (105), artrite reumatóide (106) e tuberculose (107). Sua expressão está também aumentada nas células inflamatórias associadas com outras doenças incluindo o câncer (108), a nefrite tubulointersticial (109), o infarto do miocárdio (110), a estenose arterial (111), a distrofia muscular (112) e a fibrose pulmonar idiopática (113).

Vários estudos apontam para o papel pró-fibrótico desta proteína, uma vez que, a OPN pode ser considerada moduladora do curso da fibrose através de suas propriedades quimiotáticas e pró-inflamatórias (112). Vetrone et al (112) sugerem que a OPN desempenha papel relevante na inflamação, e através de seus efeitos no ambiente inflamatório contribui para a deposição de tecido fibrótico no músculo distrófico. Estes autores propõem que a OPN pode regular tanto as concentrações das células do sistema imune quanto, a secreção de fatores da matriz extracelular (colágeno tipo I) através dos miofibroblastos. No caso da fibrose renal, a regulação da OPN também foi descrita como fundamental para a diferenciação dos fibroblastos, um dos responsáveis pela formação do tecido fibroso (114,115). No músculo cardíaco, os níveis elevados desta proteína estão associados com a insuficiência cardíaca e a OPN pode ser um marcador prognóstico em potencial para a evolução clínica após infarto do miocárdio (116). A OPN também possui efeito pró-fibrótico no desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina (113).

A OPN é um membro da família das proteínas "Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein" (SIBLING), proteínas estas que são capazes de interagir diretamente com as proteínas da matriz extracelular incluindo a fibronectina da lâmina basal e colágeno tipo I através dos receptores de integrinas ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 8 \beta 1$, $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 7$) (117,118) e variantes de CD44 (receptor do ácido hialurônico) (86). Os receptores para OPN funcionam como mediadores para adesão, migração, e sobrevivência de uma variedade de tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos e células miogênicas (86). Uma vez secretada, a OPN pode ser clivada tanto pela trombina (que é classicamente

conhecida como um ativador da cascata de coagulação) quanto por MMPs da matriz extracelular, tais como, MMP₂, MMP₃, MMP₇, MMP₉ (119) e MMP₁₂ (120). As MMPs e a trombina são capazes de clivar a OPN, expondo os domínios arginina-glicina-aspartato (RGD) e a sequência serina-valina-valina-tirosina-glutamato-leucina-arginina (SVVYGLR) capazes de interagir com os receptores de integrinas e CD44 (86,121). Após a clivagem, OPN expõe seus sítios que se ligam aos receptores de integrina (122,123) e/ou CD44 (124) às moléculas de fibronectina e colágeno da matriz extracelular (112,124) para promover adesão e transdução de sinais celulares (86).

Do exposto, parece claro que a OPN pode ser considerada uma proteína que pode tanto contribuir positivamente como negativamente em processos fisiológicos e fisiopatológicos. No presente estudo, investigaremos o curso da expressão da OPN em um modelo de lesão muscular causado pelo veneno de *B. lanceolatus* (Fer-de-lance), durante os períodos agudos das alterações tóxicas e períodos de reparo muscular.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar a participação da osteopontina e de algumas proteínas envolvidas na degeneração e regeneração do músculo esquelético num modelo de injúria muscular causado pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL).

2.1- Os objetivos específicos foram:

- Avaliar cronologicamente e por imunohistoquímica a mediação da osteopontina na patogênese da regeneração muscular utilizando o veneno de *Bothrops lanceolatus* como modelo de lesão. A expressão de proteínas transmembrana características de macrófagos residentes (proteína CD68) e de macrófagos migrantes (proteína CD163) foi avaliada para monitorar o processo inflamatório. A expressão dos fatores de transcrição miogênicos, myoD e miogenina foi avaliada para monitorar o processo de regeneração muscular.
- Caracterizar o curso das alterações do músculo gastrocnêmio no período de 1-48 horas (fase de degeneração) e 3-21 dias (fase de regeneração).

3 - Material e Métodos

3.1 - Veneno

O veneno de *Bothrops lanceolatus* liofilizado foi fornecido pelo Unité des Venins do Instituto Pasteur (Paris, França) e reconstituído em tampão fosfato salina-(PBS) 0,05 M (NaH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; NaCl) pH 7,4.

3.2 - Animais

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com idade de 4 semanas (200-300 g) foram fornecidos pela Central de Bioterismo da Universidade de Campinas (CEMIB-UNICAMP). A pesquisa foi conduzida seguindo as orientações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEEAA-IB-UNICAMP), protocolo nº 945-1 e está de acordo com as regras do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 - Tratamento com o veneno

O tratamento com veneno de *Bothrops lanceolatus* foi realizado em dez grupos de 12 animais (6 tratados e 6 controles) que receberam injeção intramuscular (gastrocnêmio) do veneno total (100 µg/100 µl). Os animais controle receberam 100 µl da solução tampão PBS, 0,05M, pH 7,4. Os animais foram mantidos em gaiolas onde permaneceram à temperatura de 22°C e ciclo de luz-escuro de 12 horas com ração e água filtrada sem restrições. Os animais foram sacrificados sob anestesia (Halotano) por deslocamento cervical nos seguintes intervalos de tempo de (1, 3, 6 e 18 horas; 1, 2, 3, 7, 14 e 21 dias).

3.4 - Processamento do músculo

O músculo gastrocnêmio foi dissecado e a região equatorial foi colocada imediatamente no fixador paraformaldeído 4%, onde permaneceu por 18 hs a 4°C. Após este tempo, foram realizadas 4 lavagens de 10 minutos em água destilada. Em seguida, os músculos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina de acordo com a seguinte sequência: álcool 70% (durante a noite), 80% e 95%, 45 min cada, e 100% (3x 30 min), álcool-xilol 1:1, xilol, xilol:parafina 1:1 (60°C) e parafina pura (60°C) por 30 min cada. A seguir os músculos dissecados foram incluídos em cassetes com parafina, identificados e devidamente acondicionados.

3.5 - Cortes Histológicos

Após o processamento dos músculos e inclusão em parafina foram realizados cortes seriados (5 µm) em micrótomo rotativo Leica® nº 818 e montados em lâminas silanizadas. As colorações realizadas foram Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM). As imagens foram analisadas e capturadas e analisadas usando fotomicroscópio Olympus, BX51 (Japão), objetiva 200x e 400x.

3.6 - Medida do Diâmetro da Fibra Muscular

O menor diâmetro da fibra muscular foi medido em secção transversal considerando a região equatorial do músculo gastrocnêmio. O menor diâmetro foi medido em grupo de 1 hora após injeção i.m. do veneno da *B. lanceolatus* (100 µg/100 µl) ou injeção de salina (100 µl) para detectar alterações agudas. O local danificado foi caracterizado como aquele

Material e Métodos

que continha edema e/ou necrose. A medida da fibra foi realizada utilizando o fotomicroscópio Olympus, BX51 (Japão), aumento 200X e o software Image Pro-Plus. O total de fibras medidas foi 1200 tanto em grupo tratado quanto em grupo controle (n=6 animais x 200 fibras/animal=1200 fibras medidas).

O menor diâmetro da fibra muscular também foi medido em grupo de 21 dias após injeção i.m. do veneno da *B. lanceolatus* ou de salina. O menor diâmetro da fibra muscular foi medido considerando a região equatorial do músculo gastrocnêmio. Tanto as fibras regeneradas com núcleos localizados centralmente como as fibras intactas com núcleos periféricos em torno da região de regeneração foram medidas. Foram observados 205 células regeneradas, e, portanto, um número correspondente de células intactas também foram medidas no grupo envenenado de 21 dias. Para se ter certeza de que as fibras intactas, com núcleos periféricos, em torno da região regenerativa dos músculos envenenados foram ou não realmente afetadas por veneno, 205 fibras do controle de 21 dias (PBS) foram medidas para comparação. As medidas do menor diâmetro foram realizadas em fotomicroscópio Olympus, BX51 (Japão), 200X com o software Image Pro-Plus.

3.7 - Imunohistoquímica

Cortes de 5 µm foram desparafinados em xilol (I-60°C e II- temperatura ambiente) por 15 min cada, e rehidratados em banhos de etanol de concentrações decrescentes seriadas (100%-3vezes; 95%; 80%; 70%, por 5 min cada) e água destilada. Após a rehidratação, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela imersão em peróxido de hidrogênio 3% em água destilada. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica por

Material e Métodos

calor úmido (panela a vapor) em tampão citrato (10 mM, pH 6.0), por um período de 30 minutos (95-99°C) ou conforme recomendado pelo fabricante do anticorpo. Para bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com leite em pó reconstituído (Molico cálcio plus) 3%. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo primário específico (Tabela 1), por 16-18 h, em câmara úmida, a 4°C. Após este tempo, a revelação foi realizada utilizando os kits AdvancedTM HRP Link (Dako®; Ref. 4068) para anti-miogenina e anti-MyoD e o kit EnVision (Dako®; Cod. K1395) para anti-CD68, anti-CD163 e anti-OPN. E, por último foi aplicado o cromógeno substrato + Diaminobenzidina-DAB (AdvancedTM HRP/EnVision HRP). A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Erlich. O controle negativo incluiu omissão do anticorpo primário, substituído por tampão (PBS/BSA 1%).

Tabela 1. Marcadores imunofenotípicos utilizados para identificação das células estudadas.

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição	Especificação
Anti-myoD monoclonal	Dako®	M3512	1:50	em proliferação Liga-se às proteínas nucleares de mioblastos
Anti-miogenina monoclonal	Dako®	M3559	1:100	Liga-se às proteínas nucleares de mioblastos em tecido muscular
Anti-CD68 monoclonal	Dako®	M0718	1:200	Identifica macrófagos residentes
Anti-CD163 monoclonal	Serotec	MCA342R	1:50	Identifica macrófagos migrantes
Anti-OPN monoclonal	Sigma	O7264	2 µg/mL	Marcadores de fatores de crescimento derivados de macrófagos

3.8 - Dupla marcação

A dupla marcação para os anticorpos anti-CD68 e anti-OPN foi realizada para comprovar expressão de osteopontina (OPN) por macrófagos M1 que contém a proteína transmembrana CD68. Para tal foi utilizado o kit dupla marcação Envision (Dako®) para revelação. Este kit usa enzima fosfatase alcalina que revela a reação em vermelho e peroxidase que revela a reação em marrom.

3.9 - Análise e quantificação das Imagens

Anti-osteopontina

A quantificação da imunoreatividade desta proteína foi realizada em doze campos por intervalo de tempo, por animal (n=6). Todas as imagens dos campos foram fotografadas com a utilização do fotomicroscópio Olympus BX51 (Japão). Para a captura, todos os parâmetros empregados foram padronizados como intensidade de luz, 200X de aumento e padrão 24 bits de cores. As imagens foram capturadas utilizando um computador integrado em sistema de análise de imagens Image Pro-Plus 4.0, Media Cybernetics (USA). A análise de imagens (quantificação de densidade óptica de imunoreatividade do anticorpo) foi realizada pelo software GIMP 2.6.4 (GNU Image Manipulation Program, CNET Networks, Inc. Australia) para segmentar as imagens por cores. Neste software, selecionamos as cores referentes a marcação imunohistoquímica, e obtivemos a contagem da porcentagem de pixels.

Anti-CD68 e Miogenina

Para estes marcadores, a quantificação foi realizada por meio de contagens de células positivas em dez campos diferentes dentro da área danificada por corte, por animal, por intervalo de tempo (n=6, 60 campos por intervalo de tempo) tanto para grupo controle quanto para grupo envenenado. A contagem foi realizada com o auxílio do fotomicroscópio (Olympus, BX51), aumento de 200X.

3.10 - Análise Estatística

Os dados da imunohistoquímica foram apresentados como média dos grupos $\pm$ desvio-padrão. Comparações múltiplas foram feitas usando análise de variância (one way ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação de Bonferroni (Graphpad Prism 4.0 software, San Diego, CA, USA). Para cada medida do menor diâmetro da célula muscular foi usado o teste *t*-Student para comparar grupos controle e tratado 1 hora após a injúria, e as fibras intactas e regeneradas de 21 dias de grupos envenenados e fibras normais de grupos controles de 21 dias. O valor de $p < 0,05$ indicou a significância estatística.

4. Resultados

4.1 - Análise Histológica

O músculo gastrocnêmio dos animais controle (100 µl de PBS) apresentou morfologia normal sem alteração aparente dos vasos sanguíneos ou tecido conjuntivo em todos os intervalos de tempo (Fig. 3A). Logo após 1 hora de injeção i.m. de veneno de *B. lanceolatus* (VBL) foi observada intensa hemorragia, edema nas fibras musculares (Fig. 3B, 5B), sendo que, apenas algumas fibras apresentavam aparência hialina (Fig. 3B). O edema foi evidenciado pelo aumento do espaço intersticial e da fibra muscular e pela perda do seu perfil poligonal no período entre 1 e 3 horas. Com 3 horas, os neutrófilos foram observados no infiltrado inflamatório na área afetada pelo veneno (Fig. 3C). A hemorragia era menos intensa a partir de 6 horas, sendo substituída por focos de infiltrado inflamatório rico em neutrófilos sendo que, após as 18 horas os macrófagos foram aumentando gradualmente não somente no espaço intersticial como também dentro da fibra necrótica (Fig. 3D). Com 3 dias foi possível observar a proliferação de mioblastos no local de lesão (Fig. 3E). E aos 7 dias, os mioblastos estavam abundantes, sendo que, os miotubos também foram observados. A figura 5D mostra grupos de fibras pequenas com núcleos localizados centralmente no período de 21 dias na área de lesão.

O tecido conjuntivo corado em azul pela técnica de Tricrômico de Masson demonstrou que a matriz colágena dos músculos controle estava espessa apenas em torno do perímio dos ramos venoso e arterial (Fig. 4A). Entretanto, nos músculos dos grupos de 1 hora pós-VBL, os feixes de colágeno apareceram desorganizados (Fig. 4B). Após este tempo, houve aumentos focais de tecido conjuntivo, principalmente no local

Resultados

de proliferação de mioblastos (3 dias) e fusão de miotubos (7 dias), dando a algumas áreas aspecto fibrótico (Figs. 4C, D).

Resultados

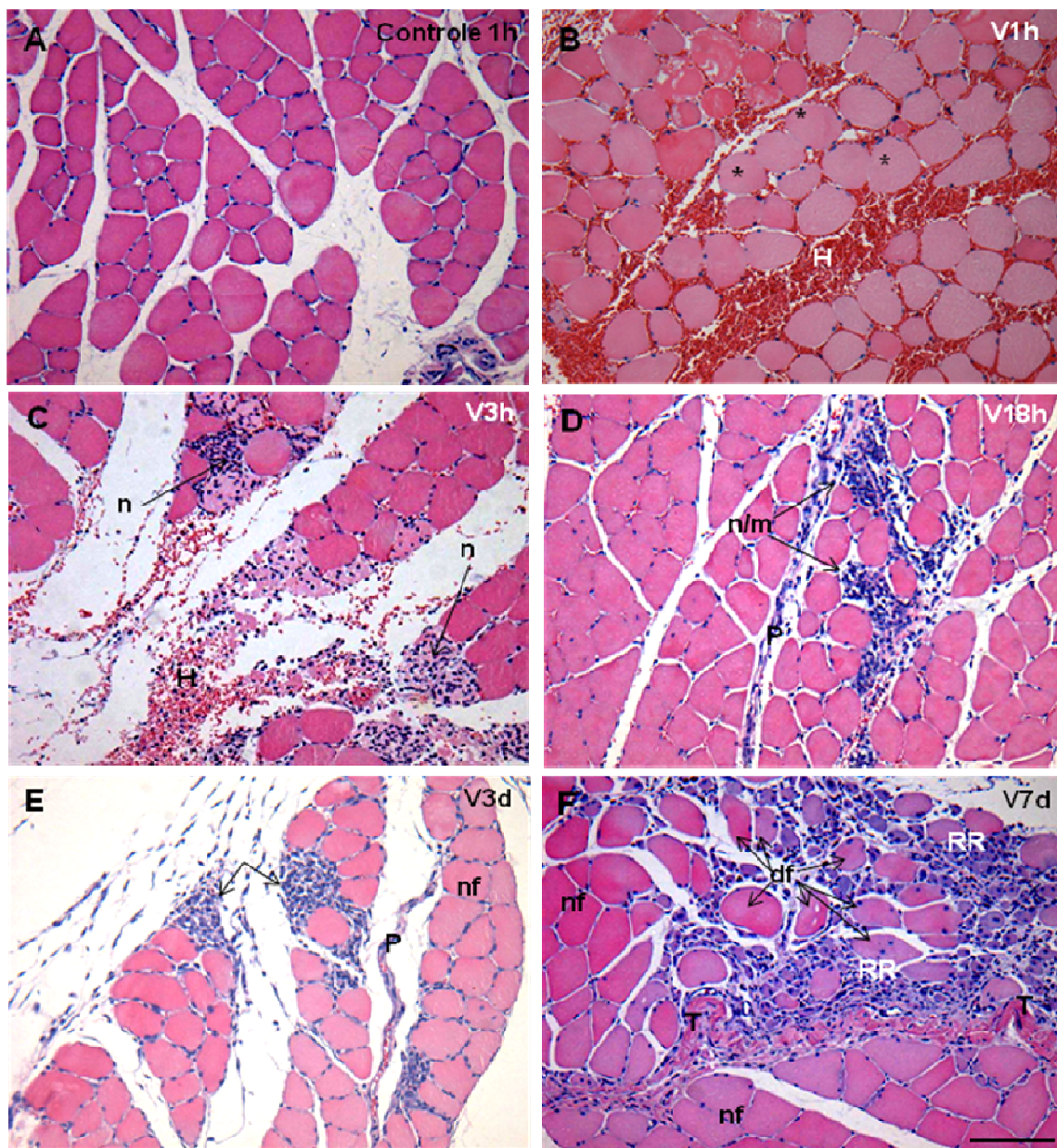


Figura 3. Cortes transversais de músculo gastrocnêmio de ratos em diferentes intervalos de tempo após injeção de PBS (A) ou veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL) (B-F). A – Grupo controle (1h) demonstrou fibras e fascículos com morfologia normal; B - V1h: uma hora pós-VBL os fascículos estavam desorganizados e houve intenso processo hemorrágico (H). Observamos poucas fibras necróticas; e a maioria das fibras estava edemaciada (*); C - V3h: neste período houve infiltração de células inflamatórias, principalmente, neutrófilos (n) no espaço intersticial e em torno das fibras necróticas; D - V18h: os macrófagos constituíam a maioria das células inflamatórias; E - V3d: neste período foi observado pequenos focos de proliferação de mioblastos em torno das fibras musculares normais (nf); F - V7d: um detalhe da região regenerativa (RR) 7 dias após VBL demonstrando mioblastos basofílicos e células de tamanhos heterogêneos (df); P = perímio, T = tendão, n/m = neutrófilo/macrófagos. Coloração HE. Barra = 40 µm.

Resultados

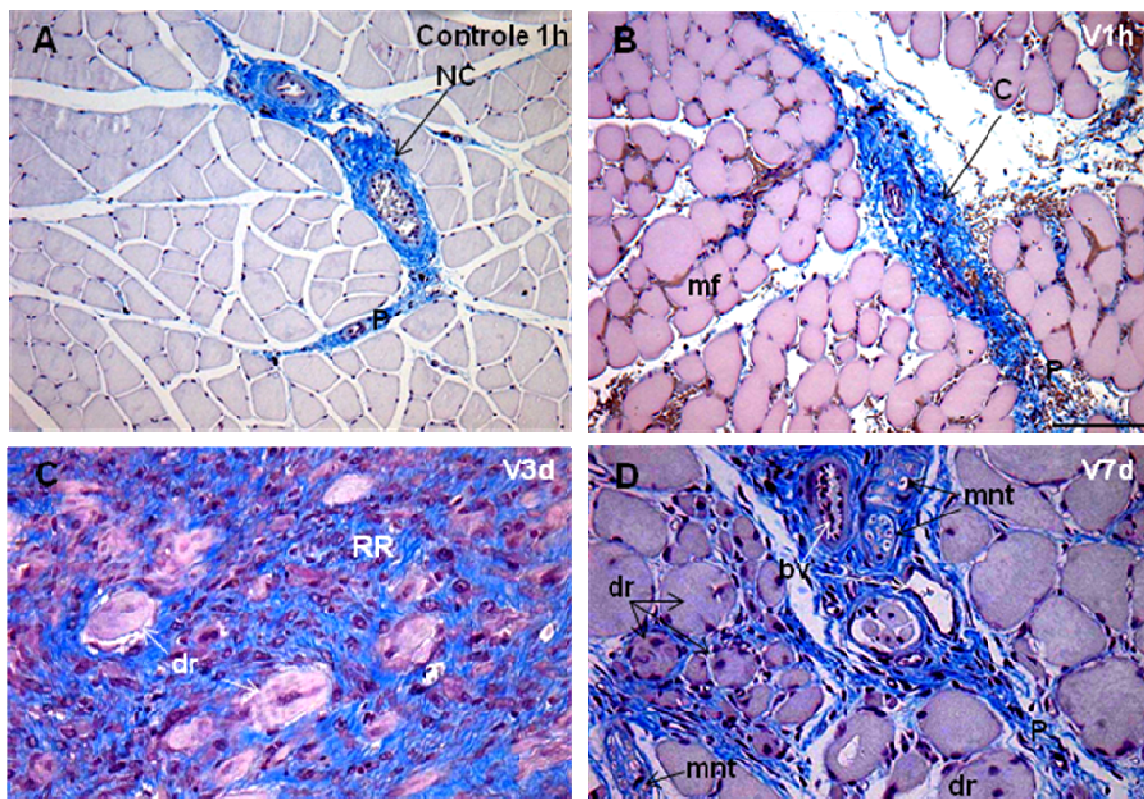


Figura 4: Coloração por Tricrômico de Masson das fibras colágenas em músculo gastrocnêmio injetado com PBS (A) ou injeção de VBL (B-D). A - Grupo controle de 1 hora apresentou matriz colágena perimisial normal em torno dos vasos sanguíneos; B - V1h: desorganização do colágeno 1 hora após VBL; C - V3d: fibrose na região de regeneração (RR): miofibras nucleadas centralmente com aspecto degenerativo (dr); D - V7d: proliferação colagênica entre os fascículos no interstício, no qual verificou-se fibras com tamanho heterogêneos; mnt=tronco nervoso motor; bv=vasos sanguíneos, P= perimísio, mf=fibra muscular, . A e B - Barra = 40 μ m; C e D - Barra = 25 μ m.

4.2 - Morfometria: Diâmetro da Fibra Muscular

Ao tempo de 1 hora após injeção de veneno de *B. lanceolatus*, a média dos valores do menor diâmetro das fibras na região muscular afetada, estava significativamente maior ($59.8 \mu\text{m} \pm 8.2$; $n=6$) que o do grupo controle ($39.9 \mu\text{m} \pm 6.7$; $n=6$) ($P<0,05$) (Fig. 5A). Após 21 dias de envenenamento, um número relativamente pequeno de células regeneradas (205 com núcleo central) foi detectado em cortes transversais do músculo gastrocnêmio ($n=6$). Estas células apresentaram diâmetro médio significativamente menor ($21.42 \mu\text{m} \pm 5.65$) que as células intactas com núcleo periférico ($41.16 \mu\text{m} \pm 7.96$) ($P<0,05$, Fig. 5C) em torno da região regenerativa. Os valores do diâmetro médio das células intactas com núcleo periférico em torno da região regenerativa não diferiram da medida das fibras normais de 21 dias em grupos controle (PBS) ($42 \mu\text{m} \pm 6.03$) (Fig. 5E).

Resultados

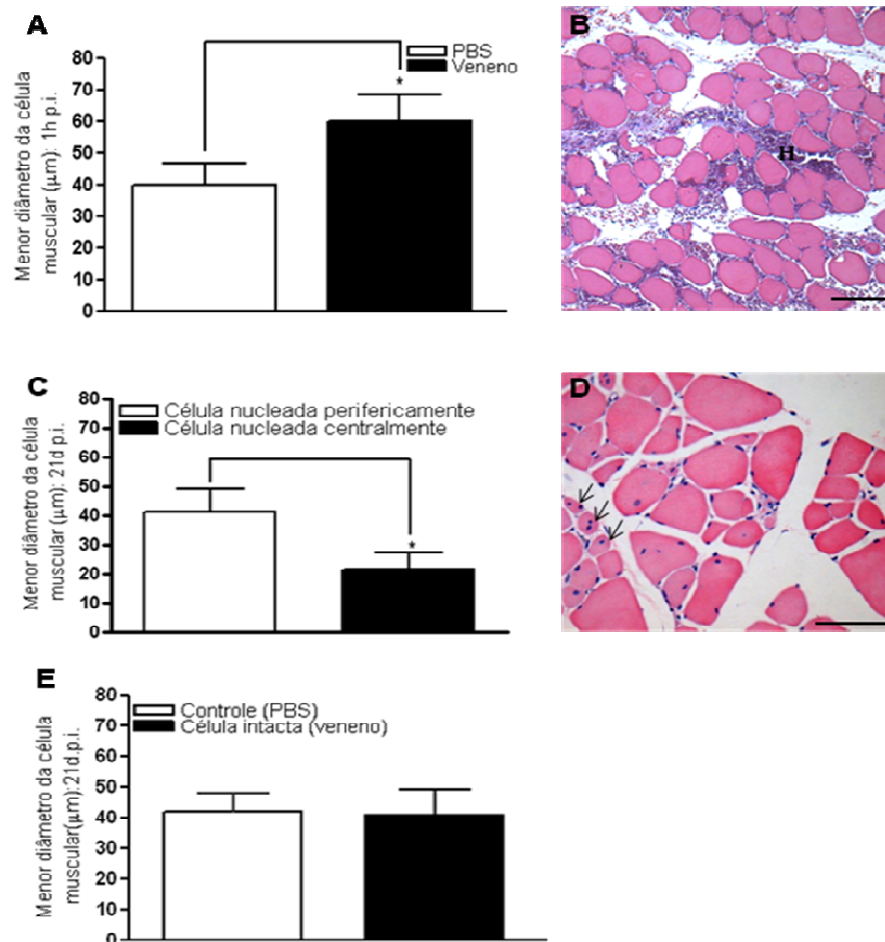


Figura 5: Medida do menor diâmetro da fibra muscular 1 hora após injeção de VBL ou PBS. A – A média do menor diâmetro dos animais tratados foi significativamente maior que os grupos controle após 1 hora de VBL (* $p < 0,05$); B - V1h: observe as fibras edemaciadas na região afetada. Barra = 25 μm. C - A média dos menores diâmetros das fibras intactas (não danificadas pelo veneno) foi significativamente maior do que aquelas regeneradas que apresentaram núcleo central 21 dias após injeção de VBL (* $p < 0,05$); D - V21d: Note a heterogeneidade nos tamanhos diferentes entre fibras intactas e regeneradas (setas). Coloração HE. Barra = 40 μm. E – Não houve diferença significativa entre a média dos menores diâmetros das fibras intactas (não danificadas pelo veneno) pós 21 dias e das fibras do grupo controle aos 21 dias após injeção de PBS. As colunas representam média $\pm$ DP (n=6) (teste *t*-Student).

4.3- Imunohistoquímica

Anti-CD68

Os macrófagos CD68+ foram observados junto às fibras musculares e também no tecido conjuntivo intersticial (Fig. 6A,B,C,D). A presença de macrófagos residentes na área de lesão foi avaliada pela expressão de CD68 em músculos tratado (VBL) em comparação com os grupos controle (PBS). O número de macrófagos expressando a proteína aumentou significativamente atingindo o pico às 24 h (461.67 ± 144.67) após envenenamento, o qual decresceu gradualmente, sendo que, de 7 a 21 dias tornou-se inferior ao observado no período de 1 hora. A contagem no tempo de 24 horas foi significativamente maior que nos demais tempos avaliados, exceto para 18 horas e 2 dias (Fig. 6E).

Anti-CD163

Apesar de várias diluições seguindo o protocolo padronizado pelo laboratório, e de acordo com as instruções do fabricante não houve expressão desta proteína nas amostras testadas em nenhum dos grupos experimentais.

Resultados

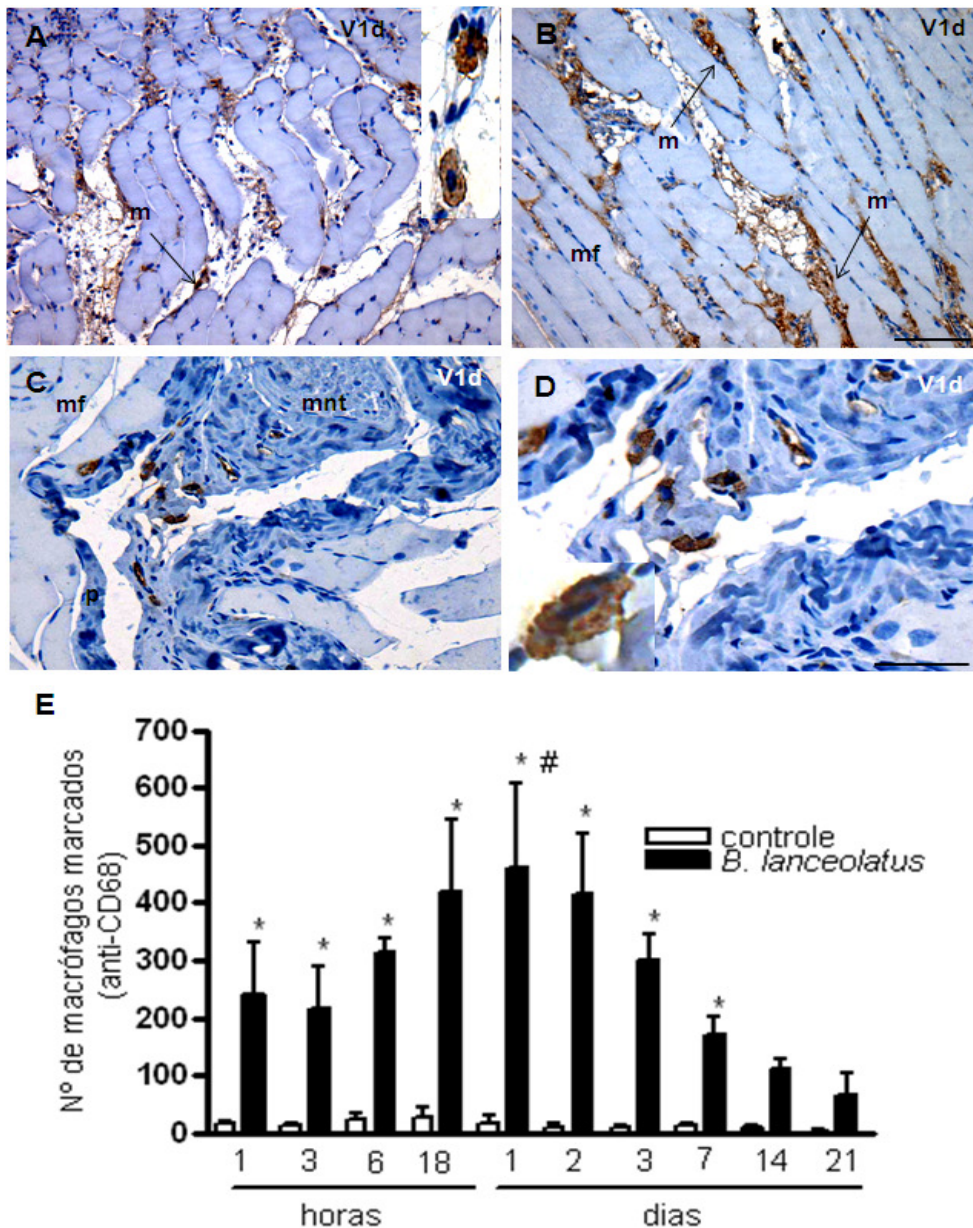


Figura 6: Imunomarcacão de macrófagos M1 (CD68+) em músculo gastrocnêmio de ratos em diferentes intervalos de tempo após injeção i.m. de VBL (100 µg/100 µl) ou PBS (100 µl). A - B - V1d: Macrófagos (m) CD68+ presentes no perímio e endomísio de fibras musculares edematosas (mf). C - D - Macrófagos M1 (m) expressando a proteína CD68, localizados em tendão (T). E - O histograma demonstra a expressão de macrófagos (CD68+). As colunas representam a média±DP (n=6). *p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 diferença entre VBL-3 dias (pico de expressão de CD68) e os demais grupos tratados (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). P=Perímio; mnt=tronco nervoso motor. Contracoloração com Hematoxilina de Erlich. A,B e C - 40 µm. D - Barra = 25 µm.

Dupla marcação OPN/CD68

Aos 3 dias, as imagens analisadas em secções de músculo gastrocnêmio injetado pelo VBL, mostrou macrófagos no espaço endomisial entre as fibras musculares. A dupla marcação para as proteínas CD68 e OPN mostrou que os macrófagos residentes expressavam essa molécula quimiotática de adesão (Fig. 7). A dupla marcação foi realizada no músculo após 3 dias, período de pico de expressão de OPN nas fibras musculares.

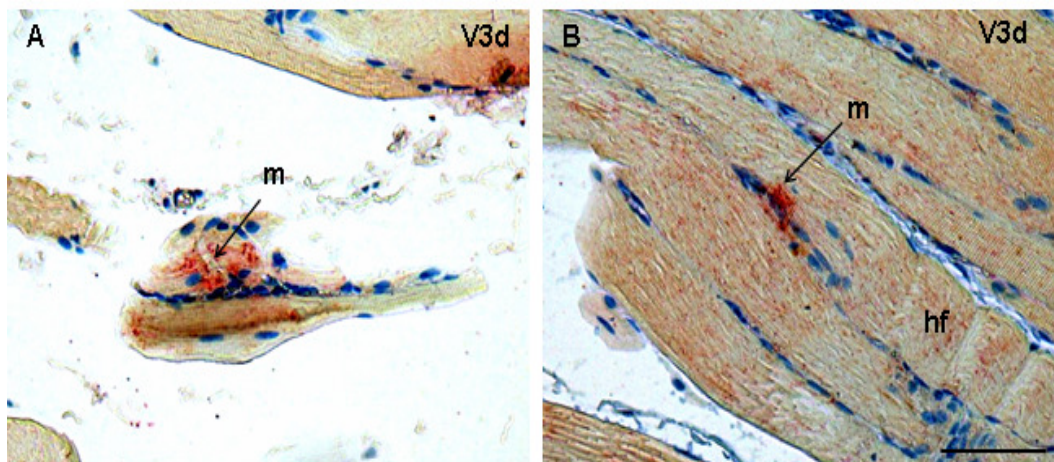


Figura 7: A, B - Dupla marcação de CD68/OPN em macrófagos residentes (fagocíticos) do VBL. Os macrófagos (m) positivos para CD68 estavam em contato com restos celulares da fibra em A, e no endomísio em B. hf=fibra hipercontraída. Contracoloração com Hematoxilina de Erlich . Barra = 25 μ m. Reação vermelha: enzima fosfatase alcalina; Reação marrom: peroxidase.

Osteopontina

A expressão da glicoproteína (OPN) foi observada tanto nas fibras musculares intactas como nas danificadas dos grupos controle (PBS) e tratado (VBL) (Fig. 8A, B). A OPN também foi observada em macrófagos, mioblastos miotubos, e fibroblastos (Fig. 9).

Osteopontina nas fibras musculares

A quantificação da imunomarcção de OPN foi realizada nas fibras musculares. As imagens capturadas foram segmentadas por seleção de cor da reação usando o software GIMP 2.6.4 (Fig. 8C,D); a densidade de pixels refletiu a intensidade da imunomarcção permitindo a quantificação comparativa (Fig. 8E). A marcação basal de OPN em grupos controle não diferiu em função do tempo pós-injeção de PBS. Por outro lado, nos músculos injetados com veneno, a proteína permaneceu abaixo dos níveis dos grupos controle até 1 hora após a injeção. A partir de 6 horas, os níveis de OPN aumentaram de forma significativa. A maior expressão de OPN ocorreu aos 3 dias (31 ± 3.1), e, a partir daí houve decréscimo gradual (7 d= 27 ± 1.2 e 14d= $24.2 \pm 3.2\%$), sendo que, após 21 dias, os níveis de OPN foram similares ao observado em 1 hora, porém significativamente mais elevados que no PBS-21 d. No grupo VBL-3 dias, os níveis de OPN foram estatisticamente superiores aos demais grupos tratados, exceto para os tempos de 2, 7 e 14 dias. Os dados de densidade em pixels em músculos controle e tratado com veneno estão demonstrados na figura 8E.

Resultados

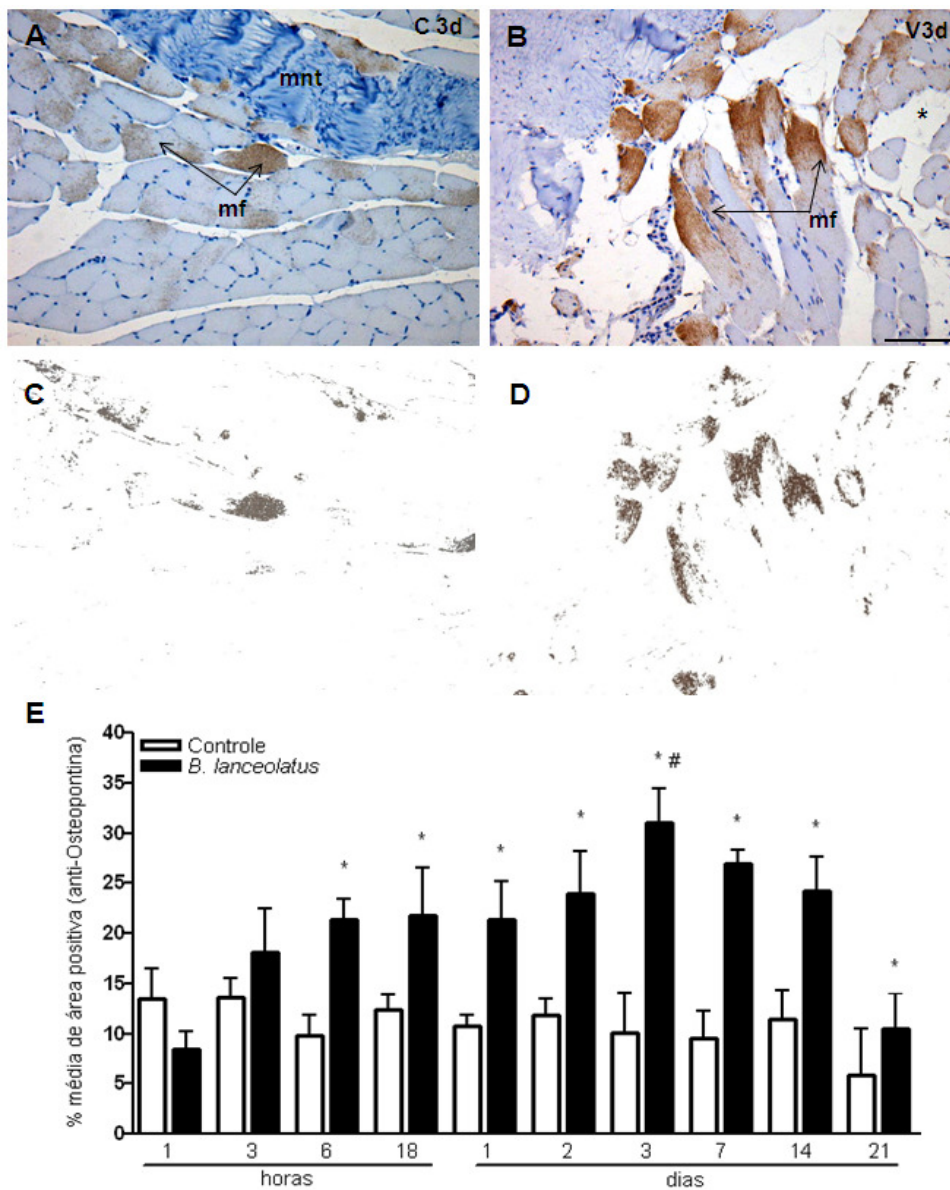


Figura 8: Imunomarcagem de OPN em músculo gastrocnêmio de ratos em diferentes intervalos de tempo após injeção i.m. de VBL (100 µg/100 µl) ou PBS (100 µl). A - C3d: No grupo controle 3 dias note as fibras intactas marcadas por OPN; B - V3d: No grupo tratado com VBL tanto as fibras intactas como as afetadas pelo veneno apresentavam-se positivas para OPN. As imagens das figuras A e B foram selecionadas apenas nas regiões imunoreativas para medir a densidade óptica de marcação de OPN (C e D). Em E, o histograma demonstra a densidade óptica da imunoreatividade de OPN ao longo dos períodos analisados em músculos tratados (VBL) e controles. As colunas representam a média ± DP (n=6). *p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 diferença entre VBL-3 dias (pico de expressão de OPN) e os demais intervalos de tempo (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). Contracoloração com Hematoxilina de Erlich. mf=fibra muscular; mnt=tronco nervo motor. Barra=40 µm.

Resultados

Osteopontina nos mioblastos e miotubos

Foi verificada reatividade de OPN na região das fibras em regeneração do músculo pelo veneno de *B. lanceolatus*. A figura 9 A-C mostrou que aos 7 dias, os mioblastos e miotubos fortemente positivos para OPN estavam presentes no local de proliferação (Fig. 9A,B).

Osteopontina nos fibroblastos e macrófagos

Os macrófagos e os fibroblastos do tecido conjuntivo intersticial estavam também fortemente positivos para OPN aos 7 dias após envenenamento (Fig. 9B-E).

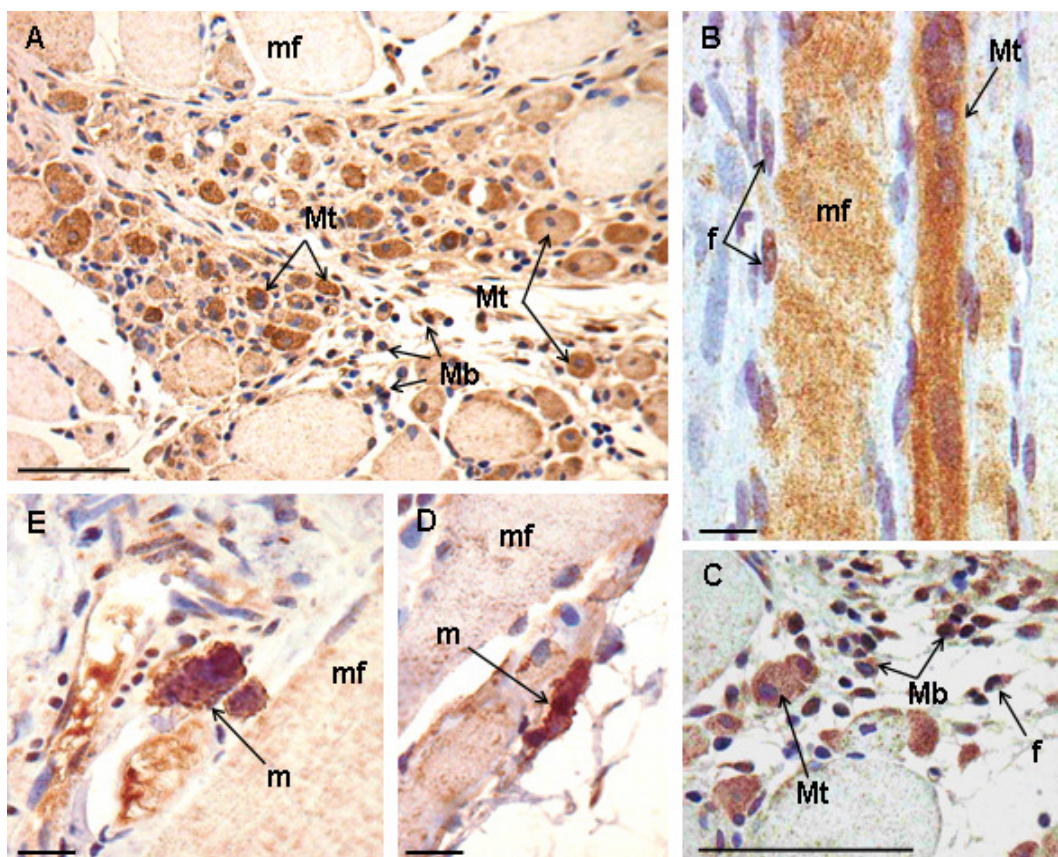


Figura 9: A-E: Imunomarcacão de OPN em miofibras (mf), mioblastos (Mb), miotubos Mt), macrófagos e fibroblastos (f) 7 dias após injeção de VBL no músculo gastrocnêmio. Contracoloração hematoxilina de Erlich. Barra= A=25 e C=30 µm; B- D-E=10 µm.

MyoD

Apesar de várias tentativas de padronização utilizando anti-MyoD, importante para estudo do início do processo de regeneração, não obtivemos marcação positiva.

Miogenina

Esta proteína foi imunodetectada tanto no núcleo quanto no citoplasma de mioblastos e miotubos (Fig. 10A), e em núcleos de miotubos (Fig. 10B) após 7 dias de injeção de veneno de *B. lanceolatus*. Os grupos tratado apresentaram os valores significativamente mais elevados entre 18 horas a 14 dias, com pico aos 7 dias ($184,4 \pm 29,4$). No período de 1 a 6 horas após envenenamento, não houve diferença na expressão de miogenina entre tratados e controles. Entre os grupos tratados, a taxa de imunomarcação aos 7 dias foi significativamente maior que nos demais tempos avaliados. (Fig. 10C).

Resultados

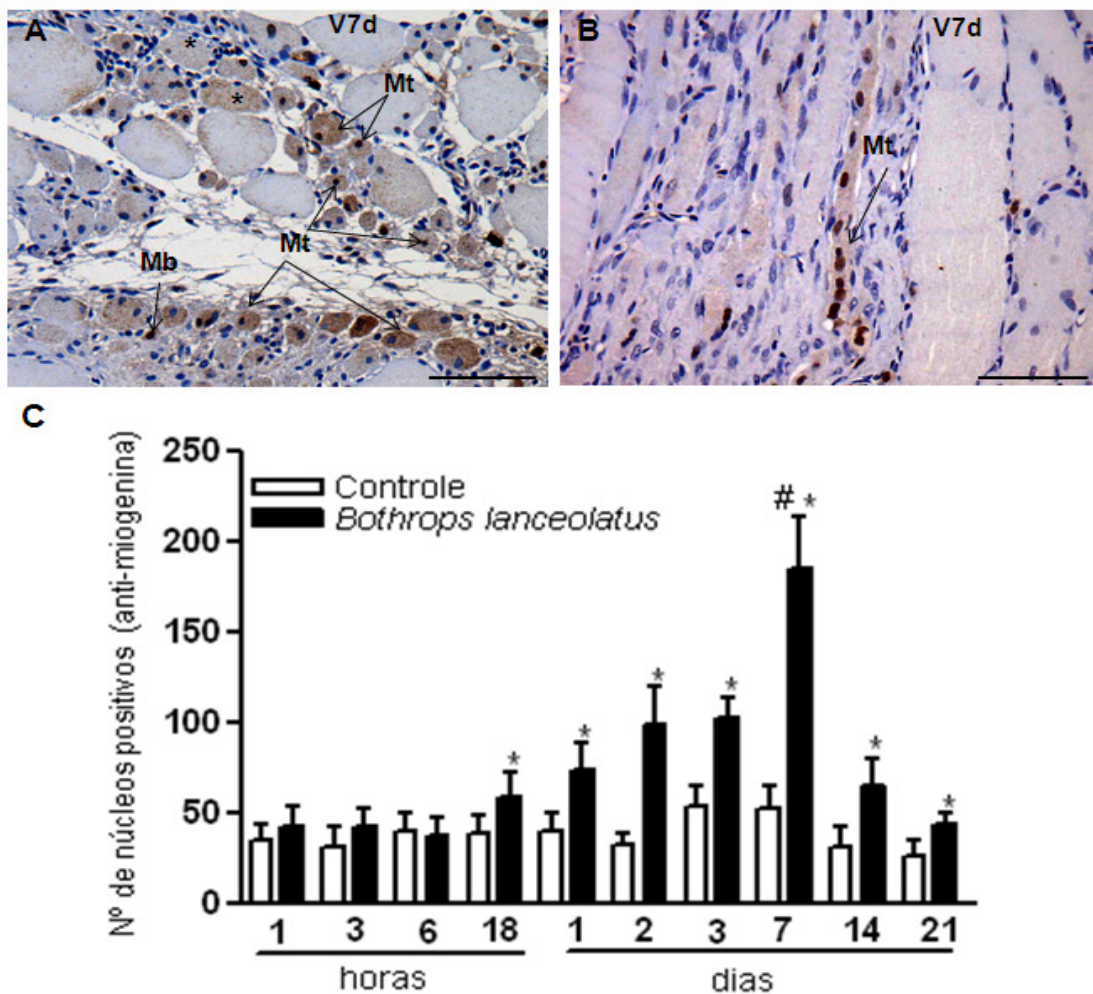


Figure 10: A, B - Imunomarcacão de anti-miogenina nas regiões de regeneração do gastrocnêmio de ratos 7 dias após injeção de VBL. Observou-se imunomarcacão para miogenina no citoplasma e no núcleo de mioblastos e miotubos (A e B). C - O histograma mostra que a expressão de miogenina foi significativamente maior no intervalo de 18h-14d atingindo o pico após 7 dias de envenenamento. As colunas representam a média±DP (n=6). *p<0,05 em relação ao grupo controle. (#) p<0,05 diferença entre VBL-7 dias (pico de expressão da miogenina) e os demais intervalos de tempo (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni). Contracoloração com Hematoxilina de Erlich. mf=fibra muscular; nervo motor (mnt). Barra = 40 µm. Barra = 25 µm.

5 - Discussão

O veneno de *B. lanceolatus*, como outros venenos das subfamílias crotaline e viperine, produziu tipicamente danos teciduais locais e alterações compatíveis com importantes distúrbios na hemostasia. Na primeira hora após o envenenamento, os focos hemorrágicos foram proeminentes entre as fibras musculares edemaciadas ou necróticas. No período entre 3 e 6 horas, além da hemorragia, foi observado edema e infiltração local de células inflamatórias como os neutrófilos e os macrófagos, sendo os macrófagos expressos em menor número. Acredita-se que as SVMP das classes P-I (47) e P-III (5) do veneno de *B. lanceolatus* tenham tido papel importante na patogênese dos danos locais das fibras musculares aqui observados, bem como no processo inflamatório (35). As alterações locais provocadas pela ação das SVMPs foram observadas anteriormente por vários autores, inclusive Gutierrez et al. (34) e Rucavado et al. (35). É sabido que as SVMPs possuem atividade hidrolítica, pois são capazes de clivar regiões altamente seletivas e/ou peptídeos-chaves dos componentes da membrana basal, podendo afetar a interação entre a membrana basal e as células endoteliais, e entre as células endoteliais entre si, induzindo a hemorragia (7,11,26,125,126,127,128).

Lôbo de Araújo et al. (9), Rucavado et al. (35) e Guimarães et al. (59) demonstraram que a resposta inflamatória local induzida por VBL incluiu migração de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular e a participação dos metabólitos da lipoxigenase e da ciclooxygenase (COX). Por outro lado, também está associada à resposta inflamatória, a formação endógena de radicais livres de oxigênio e nitrogênio e liberação de mediadores como TNF- α , TGF- β , IGF, IL-6 (38). Sabe-se que os inflamatórios tem

capacidade de ativar as células satélites quiescentes, aumentando, desta forma, a expressão da myoD e da miogenina melhorando a regeneração muscular (39,41, 129,130,131,132,133,134).

No presente estudo, sugere-se que a resposta inflamatória desencadeada no músculo esquelético após envenenamento por *B. lanceolatus*, foi evidenciada pela infiltração de neutrófilos e macrófagos, o que pode levar a produção de mediadores endógenos como as prostaglandinas e as citocinas, além dos fatores de crescimento que estão envolvidos na ativação das células satélites, dando início ao processo de regeneração muscular (miogênese).

Nossos resultados mostraram a imunomarcagem de macrófagos M1 (CD68+) que representam uma população de células fagocíticas pro-inflamatórias. Os macrófagos M1 alcançaram níveis elevados entre 18 e 48 h após injeção de VBL. Esse intervalo de tempo se caracteriza pela presença dos fragmentos necróticos das fibras afetadas pelo veneno e que ocupavam o local da lesão. Por outro lado, verificou-se que os macrófagos (CD68+) expressaram OPN, e que a quantificação desta proteína mostrou duas fases de aumento significativo, sendo a primeira das 6 às 48 horas.

Vários trabalhos relatam que a OPN, uma fosfoproteína *O*-glicosilada, é expressa por uma variedade de células e tecidos, a qual participa de uma série de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Também conhecida como Eta1, (Ativadora de linfócito T1), é sintetizada em uma variedade de tecidos e células, incluindo as células inflamatórias e os mioblastos (96,135).

A OPN pode interagir com receptores de integrinas ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$) e variantes de CD44 (receptor de ácido hialurônico) (86,136). A interação da OPN com estes receptores permite a esta proteína mediar a adesão, migração e sobrevivência de uma variedade de tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos e células miogênicas (135). A exposição das seqüências Arg-Gly-Asp (RGD) e serina-valina-valina-tirosina-glutamato-leucina-arginina (SVVYGLR) na molécula de OPN é que facilita a interação desta com os receptores de integrina e proteínas da matriz extracelular (137,138,139) como a fibronectina. As integrinas são proteínas de ancoragem que medeiam a adesão de células (mioblastos, células do sistema imune e outras) à fibronectina, laminina e fibrilas colágenas da MEC. Durante a miogênese reparativa, as integrinas são responsáveis tanto pela fusão das células miogênicas, como pelas suas interações com as proteínas da matriz (112,140).

Estudos relatam que as enzimas com atividade tipo trombina e as metaloproteinases de matriz clivam a molécula de OPN exatamente nos sítios de ligação a integrinas e aos receptores CD44 (86). Estes dados da literatura corroboram com nossos estudos, uma vez que, as SVMPS contidas no VBL (5,47) e em outros venenos da família viperidae (26,47,141,142,143), assim como a enzima com atividade trombina presente em VBL (144) poderiam atuar sobre a molécula de OPN clivando-a e aumentando sua capacidade de se ligar as integrinas das células e da MEC.

Em nossos experimentos, o aumento da expressão da OPN aconteceu primeiro no período entre 6 a 48 horas, e secundariamente no tempo de 3 (quando ocorreu o pico) a 14 dias. Estes intervalos de tempo se correlacionam com duas fases da patogênese da lesão

muscular em resposta a injeção de VBL. A primeira fase (6-48 horas) corresponde à fase aguda ou degenerativa onde o veneno induz danos musculares desencadeando o processo inflamatório. A segunda fase (3-14 dias) se correlaciona com o período de reparo muscular, iniciando-se o mesmo com a ativação das células satélites.

Sugerimos que o aumento da OPN na fase de inflamação aguda (quando estava sendo expressa pelos macrófagos e pelas fibras musculares imunomarcadas) poderia estar atuando como citocina quimioatrativa e molécula de adesão mediando as atividades dos macrófagos e de outras células do sistema imune, como a fagocitose e a produção de citocinas e fatores de crescimento (86). Estes eventos são necessários para promover a ativação das células satélites quiescentes, migração e proliferação. Por outro lado, o aumento da expressão da OPN dos 3 aos 14 dias tem correlação temporal com o início da proliferação de mioblastos após injeção i.m. de VBL, e continua com a formação de miotubos e o aparecimento de fibras regenerativas nucleadas centralmente. Nesta segunda fase, a OPN foi expressa em células de linhagem miogênica incluindo as diferenciadas, e também em fibroblastos e macrófagos M1, como demonstrado pela dupla marcação de CD68/OPN. Sugerimos que neste intervalo de tempo o aumento da expressão de OPN pode indicar que essa proteína, através de seus sítios de ligação a receptores de integrina, estaria mediando os processos de proliferação, migração e fusão dos mioblastos em miotubos multinucleados (diferenciação) bem como a formação das miofibras (fase de maturação).

Corroborando com nossos achados, em um modelo murino de regeneração muscular, Hirata et al (102) mostraram que a expressão do gene para OPN estava significativamente elevado no período de 2 a 4 dias após injeção de cardiotoxina (CTX) do

veneno de *Naja naja atra*. Os autores propuseram que a OPN poderia ser um mediador importante na fase inicial da regeneração muscular após intoxicação com CTX. Em nossos estudos, avaliamos também a expressão de dois fatores regulatórios miogênicos, a myoD e a miogenina com o propósito de monitorar o curso da regeneração das fibras danificadas pelo veneno e correlacioná-lo com o curso da expressão da OPN. A myoD é um fator de transcrição miogênico presente nas fases de proliferação e início da diferenciação, e a miogenina é característica da fase final de diferenciação dos mioblastos (71,73,79,145). Em nosso trabalho, não foi possível demonstrar a imunomarcagem para a myoD. Por outro lado, a miogenina apresentou níveis significativamente elevados das 18 horas aos 7 dias, e embora, o decréscimo nos níveis desta proteína acontecesse a partir dos 14 dias, sua expressão ainda continuou elevada em relação ao grupo controle até o final do período de observação (Fig.8). Uma vez que a OPN, nesta fase, estava sendo expressa por mioblastos e miotubos, além das células musculares, e também por fibroblastos e macrófagos (nestas células com valores significativamente elevados em relação ao controle até o 7º dia após a injeção i.m. de VBL), sugerimos que a OPN na fase de regeneração poderia ter função na adesão dos mioblastos e destes aos elementos da matriz extracelular, proporcionando, portanto as condições apropriadas para a miogênese reparativa. Pereira et al. (96) também sugeriram que a expressão da OPN em um intervalo de tempo caracterizado pela proliferação, migração e fusão dos mioblastos refletiria um papel importante desta proteína nestes eventos. Em estudos *in vitro*, Uaesoontrachoon et al. (135) relataram que a OPN liberada por mioblastos funcionaria como um elo entre a resposta inflamatória e a

miogênese durante a fase inicial da regeneração muscular (135). Nossos achados corroboram com a cronologia vista na regulação aumentada da OPN na segunda fase e o aumento significativo da miogenina iniciado às 18 horas e atingindo o pico aos 3 dias e 7 dias após envenenamento.

Nossos resultados mostraram que apesar da miogenina ser uma proteína nuclear, a sua expressão também foi observada no citoplasma de mioblastos e miotubos. A presença de miogenina no núcleo é exigida para seu papel regulatório transcricional nos promotores miogênicos específicos (146). Tem sido sugerido que a sua retenção no citoplasma é um mecanismo para regular a atividade biológica da proteína e prevenir a diferenciação precoce; enquanto a sua passagem para o núcleo acontece quando os sinais proliferativos cessam e os níveis da proteína aumentam significativamente (146).

Em estudos *in vitro* realizados por Merly et al. (147) foi mostrado que os macrófagos podem liberar produtos que inibem a transição de células miogênicas das fases de proliferação e de diferenciação. Os produtos liberados por macrófagos seriam os fatores como TGF- β que pode suprimir a proliferação dos mioblastos, o bFGF, um fator mitogênico potente e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-BB, sendo os dois últimos citados, os prováveis responsáveis pelo retardo da diferenciação dos mioblastos (147). Em nossos experimentos, foi observado que o número de macrófagos CD68+ estavam significativamente tão elevados na fase de proliferação dos mioblastos (3 dias após VBL) quanto na fase inflamatória aguda (3-6 h). Não se sabe se a presença significativa de macrófagos M1 aos 3 dias após envenenamento, teria participação na retenção atípica da miogenina no citoplasma, retardando, assim, o reparo muscular.

Entretanto, pode ser uma hipótese plausível, pois somente aos 14 dias após envenenamento a expressão da miogenina no citoplasma de miotubos não foi mais observada, e justo nesse período o número de macrófagos diminuiu e não houve diferença significativa em relação ao grupo controle.

Outro ponto que merece atenção refere-se à função pró-fibrótica da OPN. Esta proteína foi descrita como promotora pró-fibrótica da proliferação de tecido conjuntivo fibroso em algumas doenças renais e hepáticas (148,149). Da mesma forma, o aumento da OPN foi correlacionada com o aumento da síntese e acumulação de colágeno na disfunção do músculo cardíaco (110) e do músculo esquelético de camundongos *mdx* (112). Por outro lado, os autores verificaram que a deleção do gene desta proteína reduziu a fibrose e melhorou a regeneração muscular. Nossos resultados mostraram que o veneno de *B. lanceolatus* promoveu desorganização do tecido conjuntivo perimisial durante a fase aguda do envenenamento, e, a seguir, durante a fase proliferativa dos mioblastos promoveu a deposição focal de colágeno, sendo que, em algumas regiões culminou com fibrose intersticial após 3 dias do envenenamento, intervalo de tempo este que coincidiu com a super-expressão de OPN. Sabe-se que o processo fibrótico pode representar uma barreira para a revascularização do tecido e o acesso de moléculas importantes ou células envolvidas nas interações complexas relacionadas com a regeneração muscular. Nosso estudo mostrou que a média dos valores do menor diâmetro das fibras regeneradas aos 21 dias após envenenamento foram significativamente menores que os valores do grupo controle de 21 dias. É possível que os focos de fibrose, mais a miogenina com retenção no citoplasma de mioblastos e miotubos, mais o número elevado de macrófagos até o sétimo

dia após envenenamento, poderiam ser uma explicação provável para o tamanho reduzido das fibras musculares significando que o processo regenerativo tenha sido incompleto ao final dos 21 dias post-BLV.

O presente estudo pode ser o primeiro que demonstra o curso da expressão da OPN em modelo de regeneração muscular em ratos após injeção i.m. de veneno total de *B. lanceolatus* tentando mimetizar a picada da serpente. Um estudo anterior usou modelo murino de regeneração muscular após injeção de cardiotoxina da *Naja naja atra* (família Elapidae) para investigar a expressão gênica da proteína (102).

Em conclusão, os mecanismos pelo qual a regulação das células miogênicas e não miogênicas pela OPN no modelo de estudo do veneno de *B. lanceolatus* interfere no processo de regeneração ainda não está esclarecido. Entretanto, ao considerar o aumento da OPN durante a fase inflamatória e depois durante a proliferação e diferenciação das células miogênicas, sugere que a OPN pode estar criticamente envolvida na expressiva resposta inflamatória desencadeada pela ação do veneno, e que pode modular a biologia celular da regeneração muscular esquelética de ratos. A expressão da OPN pelos macrófagos, pelos fibroblastos e pelas células da linhagem miogênica (mioblastos, miotubos e miofibras) observados neste estudo parece confirmar sua identidade como proteína quimiotática e adesiva com propriedades de citocina capaz de modular a expressão dos fatores transcricionais miogênicos, além da regeneração muscular. Em nosso modelo experimental, após 3 semanas de envenenamento, as fibras regenerativas tinham tamanho reduzido indicando a regeneração incompleta. Sugerimos que a OPN pode ter desempenhado função mediadora dupla neste modelo de regeneração muscular: um papel pró-miogênico por

mediar a ativação das células satélites, a proliferação, a fusão e a diferenciação dos mioblastos; e um papel anti-miogênico por possivelmente promover ativação dos fibroblastos e a deposição de fibrilas colágenas na região de proliferação de mioblastos. A figura 11 representa as fases de degeneração e regeneração no modelo de lesão muscular causada pelo veneno de *B. lanceolatus* em ratos, as células produtoras de OPN durante essas fases bem como o possível papel mediador desempenhado no curso do processo.

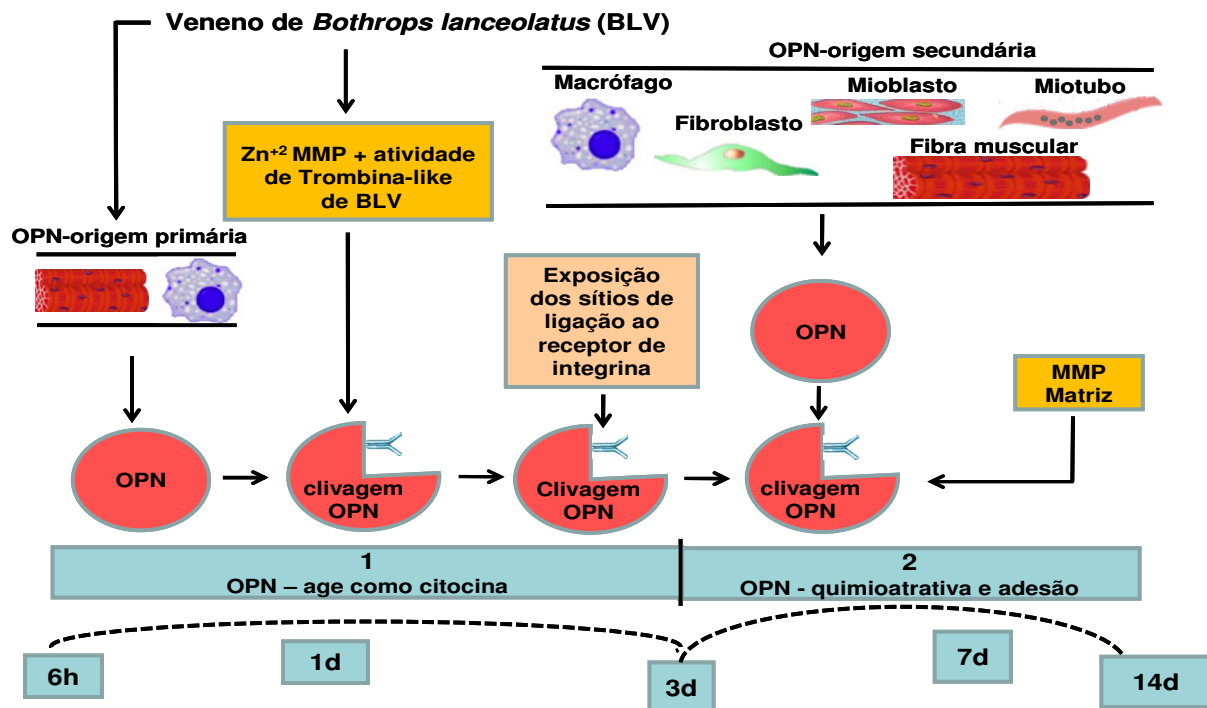


Fig. 11. Cronologia da expressão da OPN em modelo de regeneração muscular após injeção de veneno de *Bothrops lanceolatus* (VBL). A injeção i.m. de VBL desencadeia processo inflamatório, que leva os macrófagos e fibras musculares a produzirem osteopontina (OPN), sendo estas células consideradas como fonte primária da proteína. No local da lesão, os sítios de ligação (RGD) da OPN aos receptores de integrina seriam expostos pelas SVMPs e pela enzima com atividade tipo trombina do VBL, acentuando a capacidade de interação da molécula de OPN com as integrinas. A ligação do receptor de integrina presente nos elementos da matriz extracelular (MEC), macrófagos, e células satélites à OPN mediará o recrutamento de macrófagos M1 e outras células do sistema imune, fagocitose de material necrótico, migração, produção de citocinas e ativação das células satélites. No intervalo de tempo entre o processo inflamatório agudo (6 horas) até o início da proliferação de mioblastos (3 dias), a OPN agiria preponderantemente como citocina. Subsequentemente, entre 3 e 14 dias, a fonte de OPN seria representada por macrófagos, fibroblastos, mioblastos, miotubos e fibras musculares. A ação da MMP da matriz extracelular na molécula de OPN favoreceria a ligação da OPN aos receptores de integrina presentes nos elementos da MEC, mioblastos e miotubos. Neste intervalo de tempo, a OPN funcionaria como uma molécula quimiotática e de adesão mediando a proliferação de mioblastos, a diferenciação, fusão destes em miotubos e o crescimento das fibras regenerativas (provavelmente interferindo na expressão dos fatores regulatórios musculares (MRF) e acentuando a modulação da regeneração muscular e/ou reparo.

6 – Conclusão

Conclui-se que:

1. A OPN, proteína de caráter pleiotrópico, está envolvida nos processos de degeneração e regeneração do músculo esquelético após injeção de VBL, sendo que, inicialmente estaria criticamente envolvida no processo inflamatório agudo desencadeado pelo veneno, e como tal atuaria como citocina ativadora de células satélites; em fase mais tardia do envenenamento, a OPN desempenharia uma atividade quimiotática e adesiva, favorecendo a migração, proliferação de mioblastos e a formação de miotubos.

2. A superexpressão de OPN aos 3 dias após o envenenamento coincidiu com a fibrose intersticial, com deposição de colágeno observada em alguns sítios de proliferação de mioblastos. Além disso, a expressão da miogenina no citoplasma de mioblastos e miotubos juntamente com a fibrose intersticial em músculos tratados com VBL, poderia ser uma explicação provável para a regeneração incompleta ao final dos 21 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Harris JB, Johnson MA, Karlson E. Pathological responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1975; 2: 383-404.
2. Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-lance). Toxicon 1984a; 22: 719-731.
3. Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. Toxicon 1984b; 22: 115-128.
4. Gutiérrez JM, Nuñez J, Díaz C, Cintra ACO, Homsí-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. Mol. Pathol. 1991; 55: 217-229.
5. Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Angulo Y, Rucavado A, Warrell DA, Calvete JJ. Snake venomomics of the lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. J. Proteome Res. 2008; 7: 4396–4408.
6. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Venomous Animals and their Venoms. (Bücherl W, Buckley EE, eds.) 1971; pp. 345-384, Academic Press, New York.
7. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 2000; 82: 841-850.
8. Fernandes CM, Zamunér SR, Zuliani JP, Rucavado A, Gutiérrez JM, Teixeira CFP. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon 2006; 47: 549–559.

Referências Bibliográficas

9. Lôbo de Araújo A, Souza AO, Cruz-Höfling M.A, Flores CA, Bon C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in mouse hind paw. *Toxicon* 2000; 38: 209-221.
10. Boer-Lima PA, Gontijo JAR, 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.
11. Escalante T, Rucavado A, Pinto AF, Terra RM, Gutiérrez JM, Fox JW. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J Proteome Res.* 2009; 11: 5120-5131.
12. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* 2003; 42: 827–840.
13. de Souza MV, Morhy L, Arni RK, Ward RJ, Díaz C, Gutiérrez JM. Amino acid sequence of a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ homologue from the venom of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani*. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1384: 204-208.
14. Lomonte B, Gutiérrez JM. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* 1989; 27: 725-733.
15. Homsí-Brandenburg 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.
16. Díaz C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Isolation and characterization of basic myotoxic PLA₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 298: 135-142.
17. Brenes F, Gutiérrez JM, Lomonte B. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. *Toxicon* 1987; 25: 574-577.
18. Diaz-Oreiro C, Gutiérrez JM. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani*

Referências Bibliográficas

19. snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 1997; 35: 241-252.
20. Lomonte B, Tarkowsky A, Hanson LA. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 1994; 32: 1359-1369.
21. Harris JB, Vater R, Wilson M, Cullen MJ. Muscle fibre breakdown in venom-induced muscle degeneration. *J. Anat.* 2003; 202: 363-372.
22. Farsky SH, Antunes E, Mello SB. Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. 2005; 4: 401-411.
23. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009; 54: 58-75.
24. Gutiérrez JM, Arce V, Brenes F, Cháves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.* 1990; 52: 25-36.
25. Teixeira CFP, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Höfling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez JM. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve* 2003; 28: 449-459.
26. Queiroz LS, Santo-Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Muscular lesions induced by a haemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1985; 18: 337-340.
27. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 1994; 62: 325-372.
28. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RDG. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interaction with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998; 31: 853-862.

Referências Bibliográficas

29. Fox JW, Long C. The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to the snake venom metalloproteinases. In: GS Bailey, Enzymes Snake Venom, Alaken, Fort Colli, CO, 1998; pp. 151-178.
30. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stockler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. Febs. Letters 1993; 331: 134-140.
31. Hite LA, Jia LG, Bjarnason JB, Fox JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. Arch. Biochem. Biophys. 1994; 308: 182-191.
32. Teixeira CFP, Fernandes CM, Zuliani JP, Zamunér SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005; 100 (Supl. I): 181-184.
33. Moreira L, Borkow G, Ovadia M, Gutiérrez JM. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon 1994; 32: 977-987.
34. Arce A, 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. Pathol. 1991; 72: 211-226.
35. Gutiérrez JM, Romero M, Nuñez J, Chaves F, Borkow G, Ovadia M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). Exp. and Mol. Path. 1995; 62, 28-41.
36. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. Mediators Inflamm. 2002; 11: 121-128.

Referências Bibliográficas

37. Chaves F, Teixeira CF, Gutiérrez JM. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon* 2005; 45:171-178.
38. Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of muscle cells in vitro. *J. Physiol.* 2003; 553: 833-841.
39. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005; 288: R345-R353.
40. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Herardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chrétien F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2009; 37:18-22.
41. Scott A, Khan KM, Roberts CR, Cook JL, Duronio V. What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br. J. Sports Med.* 2004; 38: 372–380.
42. Tidball JG, Vallalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010; 298: R1173-R1187.
43. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 23–35.
44. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25: 677–686.
45. Vallalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18: 482–496.

Referências Bibliográficas

46. Thomas L, Tyburn B, Bücher B, Pecout F, Ketterlé J, Rieux D, Smadja D, Garnier D, Plumelle Y. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. Research Group on Snake Bites in Martinique. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52: 419–426.
47. Malbranque S, Piercecchi-Marti MD, Thomas L, Barbey C, Courcier D, Bucher B, Ridarch A, Smadja D, Warrel DA. Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the “Fer-de-Lance” pit viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 78: 856–861.
48. Stroka A, Donato JL, Bon C, Hyslop S, Lôbo de Araújo A. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. Toxicon 2005; 45: 411-420.
49. Lôbo de Araújo A, Donato JL, Moreno RA, Prado-Franceschi J. Comparison of the phospholipase A₂ blood-clotting, caseinolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. Toxicon 1990; 28:601-606.
50. Lôbo de Araújo A, Radvanyi F, Bon C. Acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* venom: purification and molecular, enzymatic and pharmacological properties. Toxicon 1994; 32: 1069-1081.
51. Lôbo de Araújo A. Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. Tese de Doutorado, FCM/UNICAMP, 1990; Campinas. P85-89.
52. Lôbo de Araújo A, Donato JL, Leite GB, Prado-Franceschi J, Fontana MD, Bon C, Simioni LR. Neuromuscular action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom and a caseinolytic fraction. Toxicon 2002; 40: 1283–1289.
53. Stocker K, Christ W, Leloup P. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen agarose. Toxicon 1974; 12: 415-417.

Referências Bibliográficas

54. Lôbo de Araújo A, Donato JL, Bon C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrinogenolytic enzyme with sterolytic activity. *Toxicon* 1998; 36: 745-758.
55. Terra RMS, Pinto AFM, Guimarães JA, Fox JW. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology *Toxicon* 2009; 54: 836–844.
56. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PloS. Negl. Trop. Dis.* 2010; 4: e727.
57. Govers-Riemslog JW, Knapen MJ, Tans G, Zwaal RF, Rosing J. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 916: 388–401.
58. Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarnieri MC, Lazzari MA, Sampaio CA, Pozner RG, Ventura JS, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 2003; 369: 129–139.
59. Faria L, Antunes E, Bon C, Lôbo de Araújo A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 2001; 39: 825-830.
60. Guimarães AQ, Cruz-Höfling MA, Araújo PMF, Bon C, Lôbo de Araújo A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflamm. Res.* 2004; 53: 284-291.
61. Arruda VA, Guimarães AQ, Hyslop S, Ferreira de Araújo PM, Bon C, Lôbo de Araújo A. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into peritoneal cavity of mice. *Toxicon* 2003; 23: 691-706.

Referências Bibliográficas

- 62.** Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J. Interaction between macrophages, TGF-beta 1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J. Cell. Physiol.* 2008; 214:2527-2538.
- 63.** Koh A, Batista da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Hyejin L, Michael G, Jaro S, Ron Z. Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology* 2007; 122: 466-475.
- 64.** Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide* 2009; 21: 157–163.
- 65.** Robertson TA, Maley M, Grounds MD, Papadimitriou JM. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp. Cell. Res.* 1993; 207: 321-331.
- 66.** Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp. Cell. Res.* 2010; 316: 3050-3058.
- 67.** Cantini M, Massimino ML, Bruson A, Catani C, Dalla LL, Carraro U. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 202:1688–1696.
- 68.** Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004; 84: 209 –238.
- 69.** Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961; 9: 493-495.
- 70.** Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J. Anat.* 1965; 99(Pt 3): 435-444.
- 71.** Siegel AL, Atchison K, Fisher KE, Davis GE, Cornelison DD. 3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells.* 2009; 27:2527-2538.
- 72.** Smith CK II, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Physiol.* 1994; 159: 379–385.

Referências Bibliográficas

- 73.** Kuschel R, Reuveni ZY, Bornemann A. Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *J. Histochem. Citochem.* 1999; 47: 1375-1383.
- 74.** Henning S. The satellite cell of skeletal muscle fibres. *Braz. J. Morphol. Sci.* 2006; 23:159-172.
- 75.** White TP, Esser KA. Satellite cell and growth factor involvement in skeletal muscle growth. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1989; 21: S158-S163.
- 76.** Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *J. Cell. Biol.* 2004; 166: 347–357.
- 77.** Broek RWT, Grefte S, Von Den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Physiol.* 2010; 224: 7–16.
- 78.** Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1991; 23: 801-810.
- 79.** Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993; 75: 1351–1359.
- 80.** Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2005;16: 575–584.
- 81.** McKay BR, O’ Reilly EC, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parisel G. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J. Physiol.* 2008; 586: 5549–5560.
- 82.** Schabort EJ, van der Merwe M, Loos B, Moore FP, Niesler CU. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp. Cell. Res.* 2009; 315: 373-384.
- 83.** Florini R, Magri KA. Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: C701-C711.

Referências Bibliográficas

- 84.** Kovacs EJ, Dipietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854–861.
- 85.** Cannon JG, St Pierre BA. Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 179:159–167.
- 86.** Allen RE, Boxhorn LK. Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.* 1987; 133: 567–572.
- 87.** Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008; 19: 333-345.
- 88.** Boonen KJ, Post MJ. The muscle stem cell niche: Regulation of satellite cells during regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008; 14: 419–431.
- 89.** Grounds MD, Sorokin L, White J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 2005; 15: 381-391.
- 90.** Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002; 3: 207–214.
- 91.** Heissig B, Nishida C, Tashiro Y, Sato Y, Ishihara M, Ohki M, Gritli I, Rosenkvist J, Hattori K. Role of neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 in tissue regeneration. *Histol. Histopathol.* 2010; 25: 765-770.
- 92.** Raffeto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75: 346-359.
- 93.** Kitchen S, Bazin S. *Eletroterapia de Clayton*. 10ª ed. Manole, São Paulo. 1998.
- 94.** Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. In: *Revista Fisioterapia em Movimento*. 2005; 18: 63 -71.
- 95.** Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol.* 1993; 13: 225-303.

Referências Bibliográficas

96. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environment insults: regulation of inflammation, tissue remodeling and cell survival. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 1055-1061.
97. Pereira RO, Carvalho SN, Stumbo AC, Rodrigues CAB, Porto LC, Moura AS, Carvalho L. Osteopontin expression in coculture of differentiating rat fetal skeletal fibroblasts and myoblasts. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2006; 42: 4-7.
98. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17: 463-474.
99. Weber GF, Cantor H. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 241-248.
100. Liu L, Chen S, Giachelli CM, Ratner BD, Jiang S. Controlling osteopontin orientation on surfaces to modulate endothelial cell adhesion. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2005; 74: 23-31.
101. Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ramírez B, Rodríguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 3719-3727.
102. Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological Role of Osteopontin in Hepatic inflammation, Toxicity, and Cancer. *Toxicol. Sci.* 2008; 103: 4-13.
103. Hirata A, Masuda S, Tamura T, Kai K, Ojima K, Fukase A, Motoyoshi K, Kamakura K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 203-215.
104. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 1450-1462.

Referências Bibliográficas

- 105.** Agnholt J, Kelsen J, Schack L, Hvas CL, Dahlerup JF, Sorensen ES. Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand. J. Immunol.* 2007; 65:453– 460.
- 106.** Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol.* 2002; 168: 2096 –2099.
- 107.** Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, Umeshita-Sasai M, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, Saeki Y. Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 1094 –1101.
- 108.** Nau GJ, Chupp GL, Emile JF, Jouanguy E, Berman JS, Casanova JL, Young RA. Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am J Pathol.* 2000;157: 37– 42.
- 109.** Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS, Harris JF, Bautista D, Chambers AF. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1997; 121: 578 –584.
- 110.** Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM, Johnson RJ. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1994; 45:515–524.
- 111.** Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48: 538-543.

Referências Bibliográficas

- 112.** O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 1648–1656.
- 113.** Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, Miceli MC, Spencer MJ. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1583-1594.
- 114.** Pardo A, Gibson K, Cisneros J, Richards TJ, Yang Y, Becerril SY, Herrera I, Ruiz V, Selman M, Kaminsk NUP-Regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 2005; 2: e251.
- 115.** Yu XQ, Fan JM, Nikolic-Paterson DJ, Yang N, Mu W, Pichler R, Johnson RJ, Atkins RC, Lan HY. IL-1 up-regulates osteopontin expression in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Am J Pathol* 1999; 154: 833–841.
- 116.** Zhou C, Wu J, Torres L, Hicks JM, Bartkowiak T, Parker K, Lou YH. Blockade of osteopontin inhibits glomerular fibrosis in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 2010; 32: 324-331.
- 117.** Graf K, Stawowy P. Osteopontin: a protective mediator of cardiac fibrosis? *Hypertension* 2004; 44: 809–810.
- 118.** O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.* 2000; 81: 373-390.
- 119.** Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 2001; 280: 460-465.

Referências Bibliográficas

- 120.** Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 28261–28267.
- 121.** Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, Ferreras M, Sato T, Shapiro SD, Foged NT, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* 2004; 34: 37–47.
- 122.** Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell. Commun. Signal.* 2009; 3: 311-322.
- 123.** Bayless KJ, Meininger GA, Scholtz JM, Davis GE. Osteopontin is a ligand for the alpha-4 beta 1 integrin. *J. Cell. Sci.* 1998; 111:1165-1174.
- 124.** Ito K, Kon S, Nakayama Y, Kurotaki D, Saito Y, Kanayama M, Kimura C, Diao H, Morimoto J, Matsui Y, Uede T. The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol.* 2009; 28: 11–19.
- 125.** Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1- containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999; 59: 219-226.
- 126.** Ownby CL, Geren CR. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicon* 1987; 25: 517-526.
- 127.** Hati R, Mitra P, Sarker S, Bhattacharyya KK. Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* 1999; 29: 1-19.

Referências Bibliográficas

- 128.**Moura-da-Silva AM, Marcinkiewicz C, Marcinkiewicz M, Niewiarowski S. Selective recognition of $\alpha 2\beta 1$ integrin by Jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Thromb. Res.* 2001; 102: 153-159.
- 129.**Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29: 191-197.
- 130.**Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287: C475-C483.
- 131.**Mendias CL, Tatsumi R, Allen RE. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in satellite cell proliferation, differentiation, and fusion. *Muscle Nerve* 2004; 30: 497-500.
- 132.**Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK. COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2006; 290: C1651-C1659.
- 133.**Veliça P, Bunce CM. Prostaglandins in muscle regeneration. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2008. 29: 163-167.
- 134.**Chen X, Li Y. Role of MMP in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh. Migr.* 2009; 3: 337-341.
- 135.**Malerba A, Vitiello L, Segat D, Dazzo E, Frigo M, Scambi I, De Coppi P, Boldrin L, Martelli L, Pasut A, Romualdi C, Bellomo RG, Vecchiet J, Baroni MD. Selection of multipotent cells and enhanced muscle reconstruction by myogenic macrophage-secreted factors. *Exp. Cell Res.* 2009; 315: 915-927.
- 136.**Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Tudor EM, Pike RN, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin and skeletal muscle myoblast: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function *in vitro*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40: 2303-2314.
- 137.**Mylona E, Jones KA, Mills ST, Pavlath GK. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J. Cell Physiol.* 2006; 209: 314–321.

Referências Bibliográficas

- 138.**Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D. The integrin alpha (9) beta (1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 36328 –36334.
- 139.**Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A. Distinct structural requirements for binding of the integrins alphavbeta6, alphavbeta3, alphavbeta5, alpha5beta1 and alpha9beta1 to osteopontin. *Matrix Biol.* 2005; 24: 418–427.
- 140.**Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 2302-2309.
- 141.**Heino J, K  p  l   J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des.* 2009; 15: 1309-1317.
- 142.**Rucavado A, Núñez J, Gutiérrez JM. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Pathol.* 1998; 79: 245-254.
- 143.**Laing GD, Clissa PB, Theakston RD, Moura-da-Silva AM, Taylor MJ. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 3458-3463.
- 144.**Calvette JJ. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des.* 2005; 11: 829-835.
- 145.**L  bo de Araújo A, Kamiguti A, Bon C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 2001; 39: 371-375.
- 146.**Dedieu S, Maz  res G, Cottin P, Brustis JJ. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int. J. Dev. Biol.* 2002; 46: 235–241.

Referências Bibliográficas

- 147.** Ferri P, Barbieri E, Burattini S, Guescini M, D'Emilio A, Biagiotti L, Del Grande, P, De Luca A, Stocchi V, Falcieri E. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J. Cell. Biochem.* 2009; 108:1302-1317.
- 148.** Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cells proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 1999; 22: 724-732.
- 149.** Irita J, Okura T, Kurata M, Miyoshi K, Fukuoka T, Higaki J. Osteopontin in rat renal fibroblasts: functional properties and transcriptional regulation by aldosterone. *Hypertension* 2008; 51: 507-513.
- 150.** Lorena, D., Darby, I.A., Gadeau, A.P., Leen, L.L., Rittling, S., Porto, L.C., Rosenbaum, J., Desmoulière, A., 2006. Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J. Hepatol.* 44, 383-390.

8. Anexos

8.1 - Anexo 1- Deliberação CCPG/01/2008

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/96, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º: O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, a Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), a área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.

VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.

VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.

VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.

IX. Todas as páginas com numeração “ímpar” serão impressas como “frente” e todas as páginas com numeração “par” serão impressas como “verso”.

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º: A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ único: O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

8.2 - Anexo 2- Certificado da comissão de Ética na Experimental Animal

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEa-IB-UNICAMP
--	--	---

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa-IB-UNICAMP

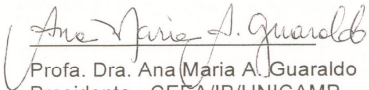
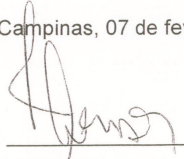
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 945-1, sobre "LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS INDUZIDA PELO VENENO DE *BOTHROPS LANCEOLATUS*" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo / Daniel Kiss Contin / Sílvia Pierre Irazusta está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 07 de fevereiro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 945-1, entitled "RATS SKELETAL MUSCLE DAMAGE INDUCED BY *BOTHROPS LANCEOLATUS* VENOM", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 7, 2006.

Campinas, 07 de fevereiro de 2006.

 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente - CEEa/IB/UNICAMP	 Fátima Alonso Secretária - CEEa/IB/UNICAMP
--	---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL	TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124
---	--