



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BRUNO KENZO KAGAWA

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VIAS UBIQUITINA-
PROTEASSOMO, FATORES DE TRANSCRIÇÃO
MIOGÊNICOS MYOD E MIOGENINA, GENE DA MIOSTATINA
DURANTE A REGENERAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO
APÓS INJEÇÃO DE VENENO BOTRÓPICO

CAMPINAS
2016

BRUNO KENZO KAGAWA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VIAS UBIQUITINA-
PROTEASSOMO, FATORES DE TRANSCRIÇÃO MIOGÊNICOS
MYOD E MIOGENINA, GENE DA MIOSTATINA DURANTE A
REGENERAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO APÓS INJEÇÃO DE
VENENO BOTRÓPICO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
Título de Mestre em Biologia Celular e
Estrutural, na área de Biologia Celular*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO BRUNO KENZO KAGAWA E
ORIENTADO PELA PROFESSORA MARIA ALICE
DA CRUZ-HÖFLING

Orientadora: Maria Alice da Cruz-Höfling

CAMPINAS

2016

Agência de fomento: CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Kenzo-Kagawa, Bruno, 1991-

K429c Caracterização da expressão das vias ubiquitina-proteassomo, fatores de transcrição miogênicos MyoD e Miogenina, gene da Miostatina durante a regeneração de músculo esquelético após injeção de veneno botrópico / Bruno Kenzo Kagawa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Maria Alice da Cruz Höfling.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Músculo esquelético. 2. Venenos de serpentes. 3. Músculos – Regeneração. 4. Fatores de regulação miogênica. 5. Via ubiquitinaproteassomo. 6. *Bothrops jararacussu*. 7. Capacidade motora – Testes. I. Cruz-Höfling, Maria Alice da, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of the expression of ubiquitin-proteasome pathway, myogenic transcription factors MyoD and Myogenin, Myostatin gene during skeletal muscle regeneration after bothropic venom injection

Palavras-chave em inglês:

Skeletal muscle

Snake venoms

Muscles – Regeneration

Myogenic regulatory factors

Ubiquitin-proteasomal pathway

Bothrops jararacussu

Motor ability – Testing

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Alice da Cruz Höfling [Orientador]

José Carlos Cogo

Márcia Regina Brochetto Braga

Data de defesa: 12-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 12 de Julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que são meus exemplos de vida, e que sempre me apoiaram e deram condições para que eu pudesse estudar e crescer.

À minha companheira Beatriz, uma pessoa extremamente especial, que ilumina minha vida todos os dias, me enche de alegria e dedica toda sua paciência pra me ajudar nas horas mais difíceis e está sempre ao meu lado, me apoiando e me dando forças pra seguir em frente.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling que abriu as portas de seu laboratório desde minha Iniciação Científica, sempre apoiando e confiando em meus projetos. Enriquecendo, não só meu intelecto, quanto também a minha vida com seu carinho e experiência profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos os seus docentes em especial Dra. Cristina Pontes Vicente, Dr. Edson Rosa Pimentel, Dra. Shirlei Recco Pimentel, Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini e Dr. Wágner José Fávaro por todo enriquecimento intelectual promovido por suas disciplinas.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual e todos os seus docentes.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), por ceder o veneno bruto de *Bothrops jararacussu*.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira por disponibilizar o equipamento CatWalk do Laboratório de Regeneração Nervosa (Departamento de Anatomia – IB/UNICAMP).

À Câmara de Ética e Pesquisa e ao Serviço de Estatística (FCM – UNICAMP) pelas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares, cuja co-orientação durante minha Iniciação Científica foi importante para meu crescimento pessoal e acadêmico, e também a seu grupo de Biologia do Desenvolvimento, que me forneceu todo suporte.

A todos os alunos do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, que me receberam de braços abertos, e cujos momentos que passamos juntos foram tão agradáveis.

À Gildo Bernardo Leite, Biólogo responsável do pelo laboratório de Junção Neuromuscular do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM), que a cinco anos atrás me ensinou boa parte das metodologias referentes à manuseio de animais de laboratório.

Às técnicas do Departamento, Cíntia, Natália, Raíssa, Dona Raquel e Célia, que sempre foram bastante solícitas em ajudar e também me salvaram de catástrofes experimentais durante muito tempo.

Aos bioteristas Toninho e Miguel do biotério da Farmacologia-FCM por cuidarem de nossos animais com todo cuidado e atenção e permitirem assim a realização plena dos experimentos.

Às Profas. Dras. Thalita Rocha e Silvia Pierre Irazusta, que sempre participaram do convívio em laboratório e me forneceram suporte e ajudaram a enriquecer o intelecto com conselhos acerca dos experimentos.

À secretária Líliam Alves Senne que, sempre muito solícita, me ajudou a esclarecer todas as dúvidas e sempre atendeu às minhas demandas burocráticas e administrativas desde a matrícula até o momento da defesa.

Aos colegas de laboratório, Monique, Edilene, Thaissa, Maria Helena e Willians. Em especial à Monique que sempre tomou frente de grande parte das questões do laboratório, desde o princípio me recebeu

muito bem e nunca deixou de ajudar e sanar todas minhas dúvidas. E Willians, que trabalhou bastante tempo em colaboração comigo e acabou me ensinando muito mais do que eu seria capaz de aprender sozinho com seus conhecimentos em áreas variadas. Todos os momentos com vocês foram muito agradáveis, especiais e muitas vezes divertidos.

À agência de fomento CAPES pela bolsa de mestrado; ao CNPq, FAPESP, PROEX/CAPES, FAEPEX e Rede NANOBIOTEC pelos recursos e suporte financeiro.

Agradeço também a todos animais de laboratório que foram utilizados para realizar essa pesquisa e são assim parte fundamental na contribuição desse trabalho à ciência.

Muito Obrigado!

RESUMO

O veneno botrópico apresenta efeitos miotóxico, hemorrágico e proteolítico que são amplamente conhecidos. Acidentes com a serpente *Bothrops jararacussu* mostram que as alterações locais no músculo, geralmente de membros inferiores, são rápidas. Dados experimentais revelam que a miotoxicidade deve-se à ação direta das miotoxinas Bothropstoxina I e II, e indiretamente pela anóxia do tecido, devido à falência da microcirculação causada por toxinas hemorrágicas, ambas presentes no veneno. Nesse trabalho foi caracterizada a expressão dos fatores de transcrição miogênicos MyoD e Myog, via ubiquitina-proteassomo (Fbx-32 e MuRF-1) e gene GDF-8. Camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, adultos jovens (6 - 8 semanas/22 – 25 g) foram divididos em 4 grupos *Bjussu*, *BthTx1*, *BthTx2* e *Sham*. Os animais do grupo *Bjussu* receberam injeção intramuscular (mm. gastrocnêmio direito) (20 µl) do veneno liofilizado (diluído em NaCl 0,9%) de serpente do gênero *Bothrops jararacussu* (*Bjssu*) na dose de 1 mg/Kg. *BthTx-I* e *BthTx-II* receberam injeção i.m. de bothropstoxina I e II respectivamente, isoladas do veneno de *B. jararacussu*, na dose de 2,5 mg/Kg e o grupo *Sham* recebeu injeção i.m. de NaCl 0,9%. Animais de todos os grupos foram sacrificados e tiveram o músculo gastrocnêmio direito coletado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-tratamento para análise de expressão qualitativa e localização proteica (imunohistoquímica) e quantitativa (*Western Blotting*). Além disso, foi realizada análise da função motora dinâmica por meio do sistema CatWalk para os grupos *Sham* e *Bjussu*, nos períodos pré-lesão, 3, 24, 48, 72 e 96 horas. Os animais do grupo *Bjussu* não realizaram apoio do membro posterior direito (mantiveram postura flexora reflexa) no período de 3 horas pós-injúria ($p \leq 0.001$) diferentemente do grupo *Sham*. Após 24 horas a função motora foi reestabelecida. Na análise de imunohistoquímica foi observada expressão de MyoD, Myog, GDF-8, Fbx-32 e MuRF-1 em todos os períodos analisados para o grupo *Bjussu*; no grupo *Sham* não foi possível observar expressão de nenhuma das proteínas. Na análise por *Western Blotting* e comparando-se o grupo *Bjussu* com *Sham* foi observado aumento de expressão de MyoD e GDF-8 no período de 96 horas ($p \leq 0.01$), Myog em 72 horas ($p \leq 0.01$) e queda de expressão de MuRF-1 em 96 horas ($p \leq 0.05$), sendo que a expressão de Fbx-32 permaneceu inalterada. Para *BthTx-I* observam-se aumentos significativos para Myog ($p \leq 0.001$), GDF-8 ($p \leq 0.01$), Fbx-32 ($p \leq 0.01$) e MuRF-1 ($p \leq 0.01$) no período de 48 horas e Fbx-32 no período de 96 horas ($p \leq 0.05$). Na análise de *BthTx-II* observa-se queda na expressão de MyoD ($p \leq 0.01$), GDF-8 ($p \leq 0.01$), Fbx-32 ($p \leq 0.01$) e MuRF-1 ($p \leq 0.01$) no período de 24 horas, e elevação da expressão de Myog ($p \leq 0.01$) e GDF-8 ($p \leq 0.01$) no período de 48 horas. De maneira geral, podemos sugerir que o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e a *BthTx-II* são capazes de ativar o processo molecular de regeneração, ao contrário do que ocorre com

a *BthTx-I*. Considerando ainda que a via ubiquitina-proteassomo não sofreu alterações em nenhum dos modelos de injúria reproduzidos.

ABSTRACT

Bothropic venom presents myotoxic, hemorrhagic and hemolytic effects that are widely known. *Bothrops jararacussu* snakebite accidents show that local changes in skeletal muscle occurs in a fast pace, usually affecting lower limbs. Experimental data show that local changes in skeletal muscle usually affect the lower limbs and evolve fast due to direct myotoxin action (mainly Bothropstoxin I and II) and also indirectly by tissue anoxia, due to failure in microcirculation caused by hemorrhagic toxins, both present in the venom. In this work, we characterized the expression of *Myogenic Regulatory Factors* *MyoD* and *Myogenin*, the GDF-8 gene and the ubiquitin-proteasome pathway (Fbx-32 and MuRF-1). Young adult male Swiss mice (*Mus musculus*) (6-8 weeks/22-25g) were divided in four groups *Bjussu*, *BthTx1*, *BthTx2* and *Sham*. Animals from *Bjussu* received intramuscular injection (right *gastrocnemius*) (20 μ l) of lyophilized *Bothrops jararacussu* venom (eluted in NaCl 0,9%) at a concentration of 1mg/Kg. *BthTx1*, *BthTx2* received i.m. injection of lyophilized bothropstoxin 1 and 2 respectively, isolated from *Bothrops jararacussu* crude venom at a concentration of 2,5mg/Kg, similarly *Sham* group was administered a 0,9% NaCl i.m. injection. Animals from all groups were sacrificed and had their muscles collected 24, 48, 72 and 96 hours post treatment for qualitative protein expression (immunohistochemistry) and quantitative (Western Blotting). In addition, the groups *Sham* and *Bjussu* went through dynamic function motor analysis (CatWalk system) in the periods of pre-injury, 3, 24, 48, 72 and 96 hours post injury. The animals from *Bjussu* did not perform support of the right hindlimb (kept a flexed in a reflex posture) 3 hours post injury ($p \leq 0.001$), unlikely *Sham* group. Motor function was reestablished 24 hours post injury. For the immunohistochemistry analysis staining for MyoD, Myog, GDF-8, Fbx-32 and MuRF-1 was observed in all periods studied in *Bjussu* group, no staining was observed in *Sham*. In Western Blotting analysis, comparing *Bjussu* with *Sham*, it was possible to observe increased expression of MyoD and GDF-8 in 96 h ($p \leq 0.01$), Myog in 72 h ($p \leq 0.01$), and decreased expression of MuRF-1 in 96 h ($p \leq 0.05$), taking into account that Fbx-32 expression remained inalterd. In *BthTx1* expression occurs to increase for Myog ($p \leq 0.001$), GDF-8 ($p \leq 0.01$), Fbx-32 ($p \leq 0.01$) and MuRF-1 ($p \leq 0.01$) in 48 h and for Fbx-32 in the 96 h post injury ($p \leq 0.05$). Analysis for *BthTx2* revealed decrease for MyoD ($p \leq 0.01$), GDF-8 ($p \leq 0.01$), Fbx-32 ($p \leq 0.01$) and MuRF-1 ($p \leq 0.01$) in 24 h and increase for Myog ($p \leq 0.01$) and GDF-8 ($p \leq 0.01$) in 48 h. We suggest that crude *Bothrops jararacussu* venom and *BthTx-2* are capable of activating the molecular regeneration process, in contrary to *BthTx-1* inability. Considering that, the ubiquitin-proteasome pathway has remained inalterd in all present injury models.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Corte longitudinal de fibra muscular esquelética.....	20
FIGURA 2 - Micrografia eletrônica de músculo esquelético	21
FIGURA 3 – Corte longitudinal de fibra muscular esquelética, mostrando a placa motora.....	21
FIGURA 4 – Processo de regeneração associado à miotrauma .	22
FIGURA 5 – Estrutura e ultraestrutura do músculo esquelético ..	23
FIGURA 6 – Miogênese embrionária	24
FIGURA 7 – Via ubiquitina-proteassomo	32
FIGURA 8 – <i>Bothrops jararacussu</i> e tipo de dente.....	35
FIGURA 9 – Distribuição de <i>Bothrops jararacussu</i> no Brasil.....	35
FIGURA 10 – Apresentação do Sistema <i>CatWalk</i>	43
FIGURA 11 – Períodos de análise da função motora dinâmica ..	43
FIGURA 12 – Parâmetro: Comprimento da Passada	44
FIGURA 13 – Expressão protéica de MyoD após injeção de veneno bruto	46
FIGURA 14 – Expressão protéica de Myog após injeção de veneno bruto	47
FIGURA 15 – Expressão protéica de GDF-8 após injeção de veneno bruto	48
FIGURA 16 – Expressão protéica de MuRF-1 após injeção de veneno bruto	49
FIGURA 17 – Expressão protéica de Fbx-32 após injeção de veneno bruto	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Perfil das vítimas de acidentes botrónico nos últimos 100 anos	35
TABELA 2 – Valores médios do <i>Apoio(s)</i> do membro esquerdo	67
TABELA 3 – Valores médios do <i>Apoio (s)</i> do membro direito	67
TABELA 4 – Valores médios da <i>Intensidade Máxima (u.a.)</i> do membro esquerdo	71
TABELA 5 – Valores médios da <i>Intensidade Máxima (u.a.)</i> do membro direito.....	71
TABELA 6 – Valores médios da <i>Velocidade de Balanço (cm/s)</i> do membro esquerdo	73
TABELA 7 – Valores médios da <i>Velocidade de Balanço (cm/s)</i> do membro direito	74
TABELA 8 – Valores médios do <i>Comprimento de Passada (s)</i> do membro esquerdo	76
TABELA 9 – Valores médios do <i>Comprimento de Passada (s)</i> do membro direito	76

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Número de ampolas de soro antiofídico indicado de acordo com a gravidade do acidente	37
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região	35
GRÁFICO 2 – Expressão de Myog após injeção de veneno bruto	53
GRÁFICO 3 – Expressão de GDF-8 após injeção de veneno bruto	54
GRÁFICO 4 – Expressão de MuRF-1 após injeção de veneno bruto	55
GRÁFICO 5 – Expressão de Fbx-32 após injeção de veneno bruto.....	56
GRÁFICO 6 – Expressão de MyoD após injeção de <i>BthTx-1</i> isolada	57
GRÁFICO 7 – Expressão de MyoD do grupo <i>BthTx1</i>	57
GRÁFICO 8 – Expressão de Myog após injeção de <i>BthTx-1</i> isolada	58
GRÁFICO 9 – Expressão de Myog do grupo <i>BthTx1</i>	58
GRÁFICO 10 – Expressão de GDF-8 após injeção de <i>BthTx-1</i> isolada	59
GRÁFICO 11 – Expressão de GDF-8 do grupo <i>BthTx1</i>	60
GRÁFICO 12 – Expressão de Fbx-32 após injeção de <i>BthTx-1</i> isolada.....	60
GRÁFICO 13 – Expressão de Fbx-32 do grupo <i>BthTx1</i>	61
GRÁFICO 14 – Expressão de MuRF-1 após injeção de <i>BthTx-1</i> isolada	61
GRÁFICO 15 – Expressão de MuRF-1 do grupo <i>BthTx1</i>	62
GRÁFICO 16 – Expressão de MyoD após injeção de <i>BthTx-2</i> isolada	62
GRÁFICO 17 – Expressão de MyoD do grupo <i>BthTx2</i>	63
GRÁFICO 18 – Expressão de Myog após injeção de <i>BthTx-2</i> isolada	63
GRÁFICO 19 – Expressão de Myog do grupo <i>BthTx2</i>	64
GRÁFICO 20 – Expressão de GDF-8 após injeção de <i>BthTx-2</i> isolada	64
GRÁFICO 21 – Expressão de GDF-8 do grupo <i>BthTx2</i>	65
GRÁFICO 22 – Expressão de Fbx-32 após injeção de <i>BthTx-2</i> isolada.....	65
GRÁFICO 23 – Expressão de Fbx-32 do grupo <i>BthTx2</i>	66
GRÁFICO 24 – Expressão de MuRF-1 após injeção de <i>BthTx-2</i> isolada	66
GRÁFICO 25 – Expressão de MuRF-1 do grupo <i>BthTx2</i>	67
GRÁFICO 26 – <i>Apoio (s)</i> do membro direito	68
GRÁFICO 27 – <i>Apoio (s)</i> do membro esquerdo.....	69
GRÁFICO 28 – <i>Apoio (s)</i> do grupo <i>Sham</i>	69
GRÁFICO 29 – <i>Apoio (s)</i> do grupo <i>Bjussu</i>	70
GRÁFICO 30 – <i>Intensidade Máxima (u.a.)</i> do membro direito	71
GRÁFICO 31 – <i>Intensidade Máxima (u.a.)</i> do grupo <i>Sham</i>	72
GRÁFICO 32 – <i>Intensidade Máxima (u.a.)</i> do grupo <i>Bjussu</i>	73
GRÁFICO 33 – <i>Velocidade de Balanço (cm/s)</i> do membro direito	74

GRÁFICO 34 – <i>Velocidade de Balanço (cm/s)</i> do grupo <i>Sham</i>	75
GRÁFICO 35 – <i>Velocidade de Balanço (cm/s)</i> do grupo <i>Bjussu</i>	75
GRÁFICO 36 – <i>Comprimento de Passada (cm)</i> do membro direito	77
GRÁFICO 37 – <i>Comprimento de Passada (cm)</i> do grupo <i>Sham</i>	77
GRÁFICO 38 – <i>Comprimento de Passada (cm)</i> do grupo <i>Bjussu</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ActRII – *Activin Receptor II*

ALK - *Anaplastic lymphoma kinase*

ANILAB - Animais de Laboratório

ANOVA – Análise de Variância

Asp49 – fosfolipase A² com Asp⁴⁹

ATP – Adenosina Trifosfato

bHLH – *Basic Helix-Loop-Helix*

Bjussu – Grupo tratado com veneno bruto de *Bothrops jararacussu*

BMP – *Bone Morphogenic Protein*

BSA – *Bovine Serum Albumine*

BthTx-I – Bothropstoxina I

BthTx-II – Bothropstoxina II

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CK – *Creatin Kinase*

cm – centímetros

cm/s – centímetros por Segundo

CO₂ – Gás Carbônico

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

E-box – *Enhancer box*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

g – gramas

HGF – *Hepactocyte Growth Factor*

IGF – *Insulin Like Factor*

IL-6 – Interleucina 6

IL-1 β – Interleucina 1 β

IFN- γ – Interferon γ

IHQ – Imunohistoquímica

Kg – Kilograma

LAAO - L-amino-ácido oxidases

LH – *Left Hindlimb*

Lys49 – fosfolipase A² com Lys⁴⁹
MAFbx - *Muscle atrophy F-box*
MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*
MEC – Matriz Extracelular
MEF - *Myogenic Enhancer Factor*
MCK - *Muscle Creatine Kinase*
Mg – Miligramas
MHC – *Myosin Heavy Chain*
min – minutos
mM – milimolar
MRF – *Myogenic Regulatory Factors*
MRF4 – *Myogenic Regulatory Factor 4*
MuRF1 - *Muscle-specific RING finger 1*
NaCl – Cloreto de Sódio
Nedd4 – *Neuronally Expressed Developmentally Downregulated 4*
NGF – *Nerve Growth Factors*
NFAT – *Nuclear Factor of Activated T Cells*
NF- κ B – *Nuclear Factor Kappa B*
NO – *Nitric Oxide*
NOS – *Nitric Oxide Synthase*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PLA₂ – Fosfolipases A₂
pH – Potencial hidrogeniônico
PI-3K - *phosphatidylinositol-3-OH kinase*
p53 – Proteína de massa molecular 53kDa
RH – *Right Hindlimb*
RNAm – RNA mensageiro
SAB – Soro antibotrópico
SABL – Soro antibotrópico-laquéutico
Sham – Grupo tratado com solução salina 0,9% (controle)
SMAD - *Small Mothers Against Decapentaplegic*
TA – Temperatura Ambiente
T β RI – *Transforming Growth Factor β Receptor*

TGF- β – *Transforming Growth Factor β*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor α*

Túbulos T – Túbulos Transversos

u.a. – Unidades arbitrárias

μm – micrômetros

μl – Microlitro

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	20
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 – Tecido Muscular Esquelético	22
2.2 – Miogênese Embrionária	25
2.3 – Lesão, Reparo e Regeneração Muscular	27
2.4 – Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e acidente ofídico	35
3 – JUSTIFICATIVA.....	39
4 – OBJETIVOS.....	40
4.1 – Objetivo Geral	40
4.2 – Objetivo Específico	40
5 – MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 – Animais	41
5.2 – Modelo de envenenamento.....	41
5.3 – Eutanásia.....	42
5.4 – Descrição dos grupos experimentais.....	42
5.5 – Técnicas de Análise	43
5.5.1 – Imunohistoquímica	43
5.5.2 – <i>Western Blotting</i>	44
5.5.3 – Análise da Função Motora Dinâmica	44
5.5.4 – Análise Estatística	46
6 – RESULTADOS	48
6.1 – Análise da Expressão Protéica com Veneno Bruto	48
6.2 - Análise de expressão protéica com Bothropsina – 1	57
6.3 - Análise de expressão protéica com Bothropsina – 2.....	62
6.4 – Análise da Função Motora Dinâmica.....	67
6.4.1 – Apoio.....	67
6.4.2 – Intensidade Máxima	70
6.4.3 – Velocidade de Balanço.....	73
6.4.4 – Comprimento da Passada	76
7 – DISCUSSÃO.....	79
7.1 – Expressão proteica em modelo de injúria reproduzido com veneno bruto de <i>Bothrops jararacussu</i>	79

7.2 - Expressão protéica em modelo de injúria reproduzido com botropsinas I e II isoladas de veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	82
7.3 - Análise de função motora após injúria por veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	84
8 – CONCLUSÕES.....	87
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
10 – ANEXOS.....	98

1 – INTRODUÇÃO

Segundo Boni *et al* (2011) são relatados cerca de 18000 acidentes botrópicos anualmente, com letalidade em 0,3% dos casos e os locais mais cometidos são os pés e as pernas, representando 70,8% de todos os casos. Considerando que a maioria dos casos acontece predominantemente nas áreas rurais, eles constituem assim um frequente agravo à saúde dos trabalhadores.

A *Bothrops jararacussu* é uma das maiores e mais pesadas serpentes da família *Viperidae* que habitam a América Latina, chegando a atingir mais de dois metros de comprimento (CORREA-NETTO *et al.*, 2010), consequentemente são capazes de produzir uma grande quantidade de veneno. No Brasil as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos (VOMERO *et al.*, 2009).

Uso de soro antiofídico é o tratamento recomendado pela OMS (1981) para os casos de envenenamento provocados por serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que este recurso é utilizado para minimizar as consequências sistêmicas do envenenamento modulando a resposta inflamatória geral, mas não retarda o processo de mionecrose aguda, ou seja, não serve como estímulo ao processo de reparo muscular.

A eficácia dos soros antibotrópicos comerciais disponíveis tem sido discutida e o Hospital Vital Brasil já reportou casos de envenenamento por *Bothrops jararacussu* onde a ação do veneno não pode ser neutralizada de maneira eficiente utilizando-se somente tratamento específico, sugerindo assim que fosse utilizada uma mistura de soros antibotrópico e anticrotático. Após essa observação Dos Santos *et al.* (1992) mostrou que uso associado de soro antibotrópico e anticrotático (contra *Crotalus durissus terrificus*) era mais eficiente na neutralização das atividades miotóxicas, coagulantes e letais, do que apenas o antibotrópico (CORREA-NETTO *et al.*, 2010).

O tecido muscular esquelético é o principal afetado em casos de acidentes com serpentes *Bothrops*, cujo veneno apresenta concentrações consideráveis de PLA₂ (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003), que são responsáveis pelas principais alterações ultraestruturais e histopatológicas observadas: rompimento de sarcolema, lesões delta, hipercontração de miofilamentos, inchaço e rompimento mitocondrial, e picnose do núcleo (QUEIRÓZ *et al.*, 1984).

O processo de necrose muscular pode ser usado para representar um dos sintomas mais eminentes e característicos do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, podendo ter como consequência perda extensiva de massa muscular e até amputação (VERONESE *et al.*, 2003).

Muitas vezes, termos como necrose local tem sido utilizados normalmente para descrever os efeitos do veneno nos tecidos epiteliais e musculares. Porém o uso desses

termos causa certa confusão e não distinguem os processos de hemorragia local e efeitos miotóxicos diretos (MEBS & OWNBY, 1990).

Neto *et al* (2004) mostra em seu trabalho que existem três fatores importantes que contribuem para a perda extensiva de massa do tecido muscular durante o envenenamento por *Bothrops jararacussu*: os danos axonais extensivos que fazem com que as fibras permaneçam desnervadas e atrofiem, e perda extensiva de células satélite que compromete assim a capacidade regenerativa das fibras, e a isquemia, que impede que células inflamatórias atinjam as células satélite e promovam sua ativação pela liberação de fatores e moléculas sinalizadoras.

A mionecrose pode ser causada pela ação direta das miotoxinas ou das fosfolipases A₂ miotóxicas diretamente na membrana das fibras musculares, induzindo a uma desorganização dos componentes de fosfolipídios, influxo de cálcio e efluxo de outras moléculas intracelulares, como por exemplo CK (creatino quinase), causando hipercontração sarcomérica e dano mitocondrial. Alterações que podem levar à morte celular. Porém os mecanismos pelos quais essas toxinas agem no tecido muscular, ainda não estão completamente elucidados (VERONESE *et al*, 2003).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Tecido Muscular Esquelético

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo, chegando a representar até metade da massa corporal, apresenta funções de respiração, manutenção da postura e locomoção, assim como produção de calor e armazenamento de aminoácidos e carboidratos contribuindo assim para a estabilidade fisiológica e funcional do organismo (KARALAKI *et al*, 2009; KHARRAZ *et al*, 2013).

Sendo os órgãos efetores do sistema locomotor, os tecidos musculares esqueléticos se encontram sob controle voluntário (HOPKINS, 2006) e é a estrutura óssea onde estão inseridos, que é utilizada como alavanca para promoção dos movimentos e cinética corporal, com exceção dos músculos da expressão facial (ARRINGTON & MILLER, 1995). Além disso também representam o maior reservatório de proteínas do corpo, podendo elas serem mobilizadas em aminoácidos livres em diversas condições de desuso muscular ou em outros estados patológicos (ATTAIX *et al*, 2005).

Os músculos cardíacos e esqueléticos são descritos como tecidos estriados graças a seu aspecto listrado, visto à microscopia de luz (Figura 1). Esse arranjo resulta da organização ordenada e regular dos elementos subcelulares contráteis (Figura 2) (HOPKINS, 2006).

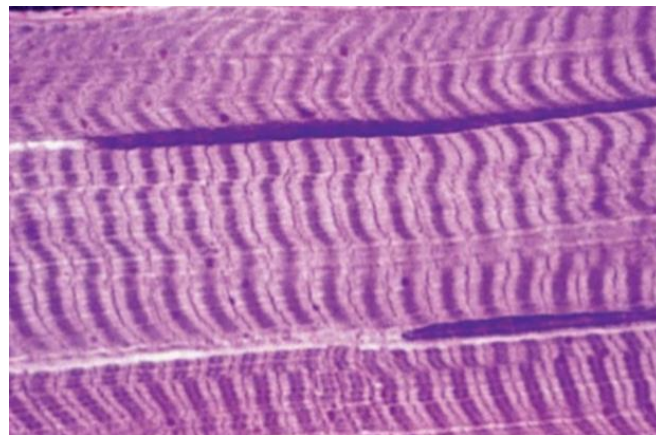


Figura 1 – Corte longitudinal de fibra muscular esquelética. Corante Giemsa. Grande aumento. Fonte: Modificado de Junqueira, L.C. Carneiro. Histologia Básica, 11^a. Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

Vistos à microscopia eletrônica de transmissão, essas estruturas estriadas, que são unidades funcionais contráteis, são denominadas de sarcômeros. Essas unidades estendem-se entre duas linhas Z, compostas por moléculas de α -actinina, e dispõem de filamentos grossos (miosina) e finos (actina) (MILLIGAN & FLICKER, 1987; GREFFE *et al*, 2007).

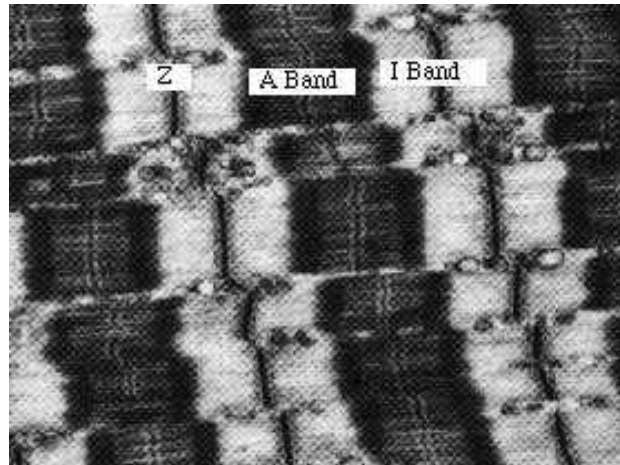


Figura 2 – Micrografia eletrônica de músculo esquelético mostrando as bandas I (menos elétrons densas) compostas principalmente de actina e em seu meio, há uma banda elétrica densa, chamada linha Z. A banda A, mais larga, composta primariamente de miosina. Fonte: Adaptado de <http://www.life.illinois.edu/crofts/bioph354/lect16&17.html>

O estímulo de contração do músculo esquelético sempre deriva de um impulso nervoso, assim cada fibra muscular deve ser inervada por placas motoras, que por sua vez derivam de neurônios motores (HOPKINS, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

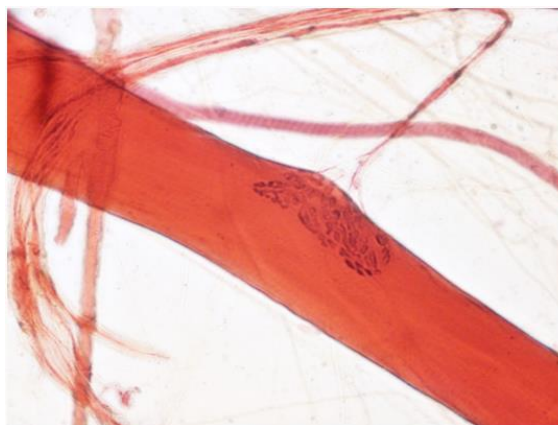


Figura 3 – Corte longitudinal de fibra muscular esquelética, mostrando a placa motora inervando a fibra. Cloreto de ouro de ranvier. Grande aumento. Fonte: Adaptado de <http://www.icb.usp.br/mol/8-10-mesq9.html>

O tecido basicamente é composto por células musculares multinucleadas, conhecidas como miofibras, que por sua vez são revestidas por tecido conjuntivo pelo qual passam os nervos e vasos sanguíneos (MEBS & OWNBY, 1990; TAKALA & VIRTANEN, 2000).

Sendo esse tecido conjuntivo distribuído na forma de três camadas, sendo a mais externa, que reveste todo o músculo e é contínua com o conjuntivo da fáscia, conhecida como epimísio. A camada intermediária, que reveste as bandas de fibras musculares é conhecida como perimísio e a camada mais fina, que reveste cada miofibrila individualmente, é conhecida como endomísio (MEBS & OWNBY, 1990; TAKALA & VIRTANEN, 2000).

Entre a membrana basal e o sarcolema se encontra um grupo de células específico, denominado de células satélite. Cerca de 30% dos mionúcleos do tecido muscular e 2-6% dos mionúcleos observados num fibra são pertencentes às células satélite (HAWKE & GARRY, 2001). Essas células são consideradas células-tronco, pois são progenitoras do tecido muscular adulto, podem se renovar e diferenciar através de diferentes vias moleculares (CHARGÉ e RUDNICKI, 2004).

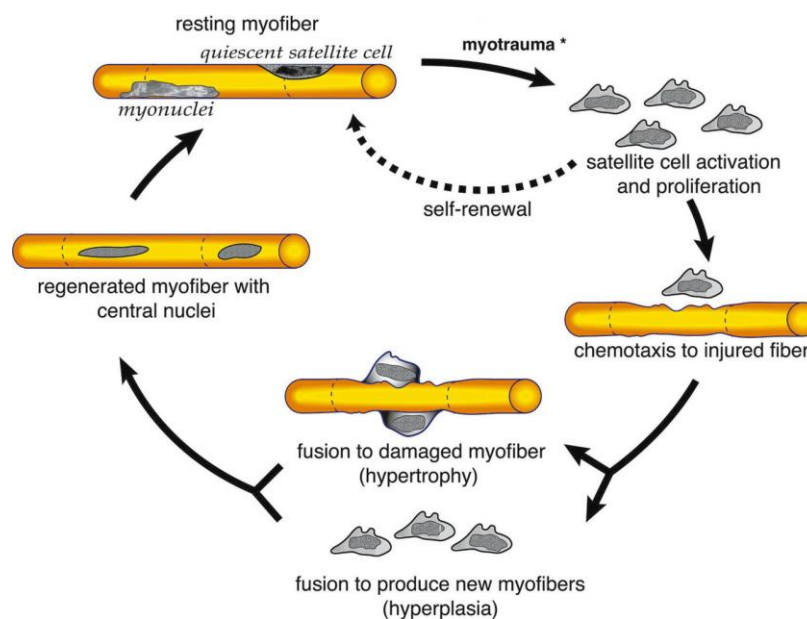


Figura 4 – Localização das células satélite no tecido muscular e resposta de células satélite a mio-traumas. Em resposta a um trauma, as células satélite se tornam ativas e passam a se proliferar, dependendo do grau de lesão, parte delas pode se fundir e diferenciar para formar novas fibras musculares, ou se fundir às fibras já existentes. Outra parte retorna à quiescência para recompor o *pool* de células satélite. Fonte: Adaptado de HAWKE & GARRY, 2001.

Todos esses elementos são necessários para a promoção de contração e movimentação uniforme das fibras musculares, quanto também para a manutenção e homeostase do tecido como um todo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

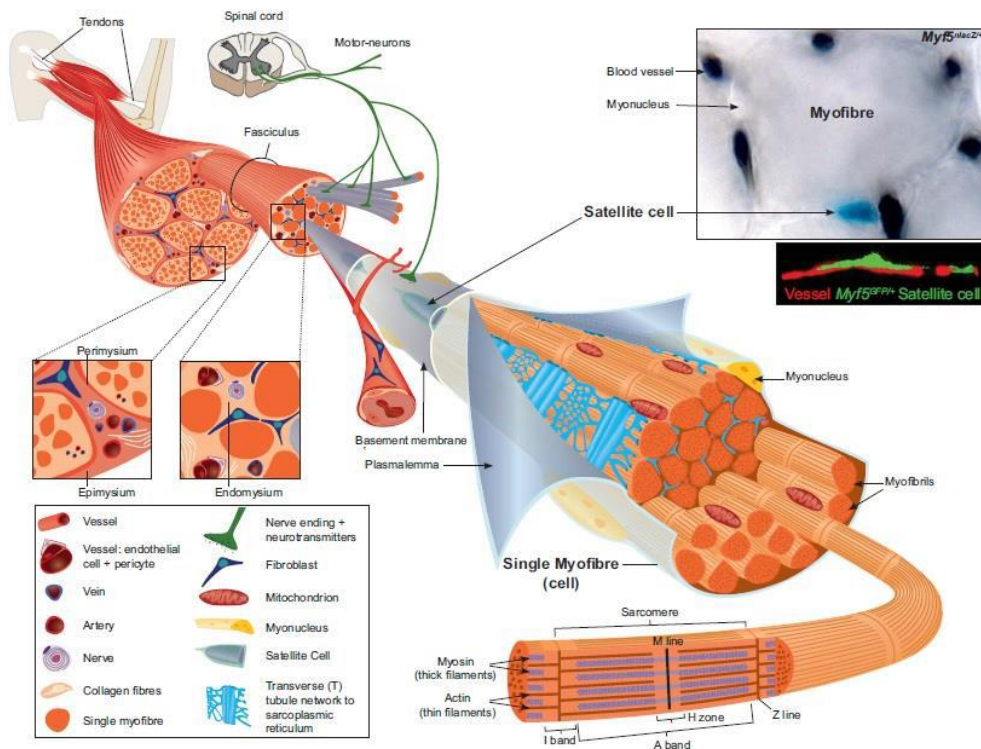


Figura 5 – Estrutura e ultraestrutura do músculo esquelético. Fonte: Adaptado de TAJBAKHSI, 2009.

2.2 – Miogênese Embrionária

Durante a embriogênese, os músculos esqueléticos da cabeça, tronco e membros de vertebrados se desenvolvem em linhagens separadas e com exceção dos músculos da cabeça, todos os outros derivam de precursores mesodermiais (mesoderma paraxial), de células originadas nos somitos (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Sendo que os somitos são divididos em domínio epaxial, que dá origem aos músculos das costas, hipaxial, que dá origem aos músculos abdominais, intercostais e à musculatura dos membros (HAWKE & GARRY, 2001).

A especificação dessas células precursoras para as linhagens miogênicas depende de aumento ou diminuição da expressão de alguns genes e fatores provenientes dos tecidos adjacentes (ectoderma, neurotubo e notocorda) (Figura 6) (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

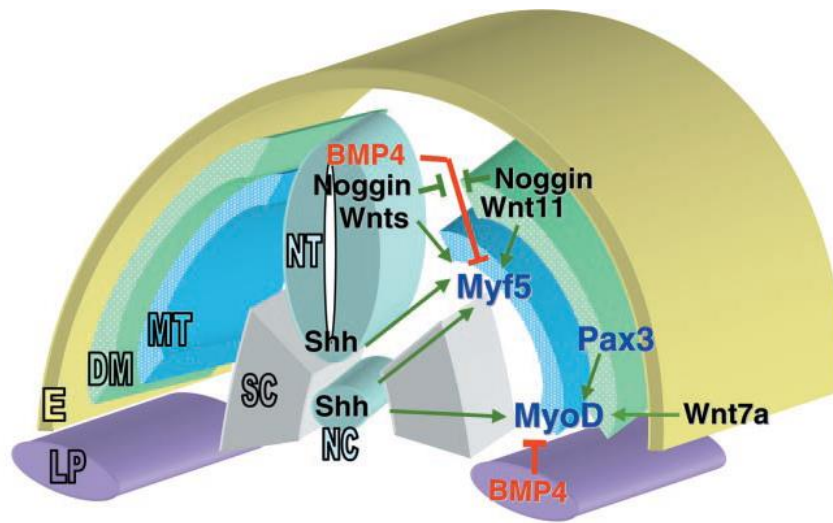


Figura 6 – Miogênese embrionária: células somíticas de origem mesodérmica localizadas na porção dorsal dos somitos (dermomiótomo - DM) recebem sinais dos tecidos adjacentes que induzem (*Wnts*, *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Noggin*) ou inibem a expressão dos MRFs primários e concomitantemente o fenótipo muscular. Fonte: Adaptado de CHARGÉ & RUDNICKI, 2004.

Essa variação de expressão entre fatores de transcrição e genes resultam no direcionamento das células precursoras para linhagem de células musculares através da regulação de uma cascata molecular hierárquica (HAWKE & GARRY, 2001).

Primeiro deve ocorrer aumento de expressão de dois fatores de transcrição (*bHLH* – *basic helix-loop-helix*) da família dos *MRF* (*Myogenic Regulatory Factors*), *MyoD* e *Myf5*, cuja função é a mesma para ambos: ativar a proliferação das células precursoras (HAWKE & GARRY, 2001; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Essa função fica evidente quando se observa perda de massa muscular extensa, durante o desenvolvimento, em animais *knockout* duplos para *MyoD* e *Myf5*, enquanto que as células progenitoras continuam a apresentar capacidade proliferativa (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Tanto para animais *knockout* para *MyoD* quanto para *Myf5* é possível observar desenvolvimento normal, o que indica assim possivelmente um mecanismo compensatório de expressão, ou seja, quando a expressão de *MyoD* está baixa, *Myf5* é superexpresso, e vice-versa (OLGUIN *et al*, 2007).

Células em fase proliferativa que apresentam a expressão de *MyoD* e *Myf5* são denominadas de mioblastos. Posteriormente esses mioblastos param seu ciclo de proliferação

para passar por diferenciação terminal e se tornarem miócitos, para isso é necessário que ocorra a expressão dos *MRFs* “tardios”, *miogenina* e *MRF4*, e em sequência os genes músculo-específicos, *MHC* (*myosin heavy chain*) e *MCK* (*muscle creatine kinase*) (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Por fim, os miócitos mononucleados se fundem uns com os outros para se tornarem um sincício multinucleado, o que eventualmente se torna uma miofibra funcional por processo de maturação (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Embriões que apresentam deficiência na expressão de *miogenina* morrem no período perinatal, devido a um déficit na diferenciação terminal de mioblastos, o que fica evidente ao observar a ausência quase que total de miofibras nesses mutantes (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

De maneira semelhante, os animais deficientes na expressão de *MRF4* apresentam uma gama de fenômenos consistente com um papel tardio na via de diferenciação miogênica (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Na década de 60 foi descoberta uma população adicional de células tronco proliferativas, localizadas entre o sarcolema e a membrana basal, que contribuem para o crescimento pós-natal, manutenção e reparo de miofibras lesionadas, devido à sua localização foram chamadas de células satélite (HAWKE & GARRY, 2001).

A população de células satélite sofre declínio em função da idade. Durante o período de crescimento muscular pós-natal ocorre uma queda dramática de proporção de mionúcleos de células satélite com o tempo, o que pode ser explicado principalmente pelo processo de fusão celular com o objetivo de aumentar a quantidade de mionúcleos das miofibras (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

Após a maturidade sexual, a proporção de células satélite continua a cair. Na faixa de idade de 1-4 meses a maior parte das miofibras murinas em cultura são capazes de produzir células satélite, porém nas idades de 9-12 meses, mais de 50% das fibras do *extensor digitorum longus* falham em produzir células satélite nas mesmas condições (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

2.3 – Lesão, reparo e regeneração muscular

A regeneração é um processo evolutivo conservado, no qual as interações entre as células inflamatórias e as células residentes devem ser altamente coordenadas para que a homeostase e a funcionalidade sejam restauradas (KHARAZ *et al*, 2013).

A perturbação entre essa interação leva à regeneração malsucedida e assim compromete a sobrevivência do indivíduo (KHARAZ *et al*, 2013).

Processos anormais de reparo do músculo esquelético podem ocorrer em dois contextos: degeneração persistente de miofibras e infiltração inflamatória aguda, como por exemplo na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), levando a deposição excessiva ou inoportuna de matriz extracelular (MEC), levando à substituição da arquitetura normal do músculo por tecido fibrótico (KHARAZ *et al*, 2013).

A capacidade regenerativa do tecido muscular esquelético depende primariamente de uma população específica de células, as células satélite, que são uma população de células miogênicas mononucleares indiferenciadas que podem ser encontradas nos músculos esqueléticos de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

São células que podem ser distinguidas morfológicamente. Em quiescência apresentam núcleo rico em heterocromatina, se comparado ao núcleo da miofibrila, relativamente volumoso se comparado ao citoplasma e conteúdo de organelas reduzido. Todas essas características indicam atividade transcricional menos ativa do que a dos mionúcleos (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

A identificação das células satélite através de microscopia ótica é ambígua, assim o uso de marcadores como laminina e distrofina para identificar, respectivamente, a lâmina basal e o sarcolema, podem facilitar sua identificação (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Elas apresentam capacidade migratória, proliferativa e também associação íntima com as miofibras, e também são responsáveis por realizar a reposição de cerca de 1 a 2% dos mionúcleos das miofibras, que são perdidos devido à função básica contrátil cotidiana (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; BUCKINGHAM, 2007; KHARRAZ *et al*, 2013).

Quando ocorre uma lesão mais aguda, uma quantidade maior de células satélite saem de seu estado quiescente e começam a se proliferar. Após vários ciclos de proliferação, a maior parte delas se diferencia e se funde para formar novas miofibras ou reparar as lesionadas (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; KHARRAZ *et al*, 2013).

Enquanto que a maior parte das células satélite estão comprometidas com os processos de proliferação e diferenciação miogênicos, uma pequena parcela dessa população passa por auto renovação com o propósito de reestabelecer o *pool* de células satélite quiescentes promovendo a manutenção da homeostase de células tronco musculares (KHARRAZ *et al*, 2013).

Aumento de densidade populacional de células satélite já foram observados em regiões próximas a junções neuromusculares e capilares adjacentes, sugerindo que fatores que emanam dessas estruturas apresentam papel crucial em enviar as células satélite para localizações específicas ou promover a manutenção de seu *pool* através de outros mecanismos (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

Além da reposição cotidiana dos mionúcleos, as células satélite também participam do reparo em vários outros modelos de lesão aguda de tecido muscular esquelético, dentre eles estão: compressão, laceração, congelamento, induzidos por contração. Independente do tipo de lesão, todas podem levar à dor intensa e também apresentar efeitos dramáticos e prolongados sobre a capacidade funcional muscular, podendo levar à incapacitação física (WARREN *et al*, 2002; WARREN *et al*, 2007).

Para que isso aconteça há necessidade de um mecanismo que traduzirá o estímulo mecânico ou o processo inflamatório gerado pelo estímulo, em sinais químicos que ativarão as células satélites. Nesse processo os *MRFs* apresentam papel extremamente fundamental (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Deve-se considerar ainda que a ativação das células satélite não fica restrita ao local da lesão, mas danos causados em uma das extremidades de uma miofibra pode ativar células satélite localizadas na outra, levando à sua proliferação e migração até o sítio de regeneração (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Após serem expostas aos sinais provenientes do ambiente lesionado, as células satélite são ativadas e entram em proliferação, essa fase é caracterizada com o aumento de expressão de dois fatores de transcrição *MyoD* e *Myf5* (aproximadamente 6 horas após a lesão), considerando que em seu estado quiescente elas não apresentam níveis detectáveis de *MRFs* (HAWKE & GARRY, 2001; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Evidências sugerem que *MyoD* e *Myf5* apresentam papéis diferentes durante a regeneração muscular, sendo que *MyoD* promove a progressão de células satélite e diferenciação terminal, enquanto que *Myf5* promove a renovação do *pool* de células satélite (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

Após a fase proliferativa, ocorre o aumento de expressão de dois *MRFs* terminais, *miogenina* e *MRF4*, seguido da ativação da p21, caracterizando a saída do ciclo celular e o início do programa de diferenciação terminal. Esse processo é finalizado com a ativação de proteínas músculo específicas, como a miosina de cadeia pesada, a formação de miotubos e maturação dos miócitos (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

A expressão de *MRF4* foi observada em miotubos recém formados e em miofibras regeneradas, indicando assim um papel distinto para *MyoD*, *Myf5* e *miogenina*, possivelmente na maturação das miofibras (CHARGÉ & RUDNICKI, 2004).

No caso de uma lesão, as células que fazem parte do infiltrado inflamatório também exercem papel fundamental para que o processo de regeneração seja bem sucedido, em paralelo à atividade das células satélite. Entre essas células se encontram os monócitos e macrófagos, que possuem um dos principais papéis no processo de regeneração (KHARRAZ *et al*, 2013).

Em resposta a dano vascular local e sinais liberados pelas miofibras degeneradas, essas células extravasam do sangue e infiltram na área da injúria e fagocitam os restos celulares de miofibras degeneradas. Em adição à essa função, as células inflamatórias produzem citocinas, mediadores inflamatórios, e sinais de dano que possuem impacto profundo no comportamento das células satélite durante o processo de regeneração (KHARRAZ *et al*, 2013).

Estudos recentes mostraram que fatores como o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), o óxido nítrico (NO) dentre outros, denominados morfógenos, são liberados e estão envolvidos nas vias de sinalização para ativação das células satélites no músculo em regeneração (FLOSS *et al*, 1997; HAWKE e GARRY, 2001; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005; KARALAKI *et al.*, 2009; VINCIGUERRA, *et al.*, 2010; PALLAFACHINA, *et al.*, 2013).

IGF-1 é um fator produzido no fígado e encontrado na circulação, e apresenta papel importante no metabolismo de insulina (HAWKE e GARRY, 2001), além disso, pode ser encontrado localmente no tecido muscular esquelético. Em situações de sobrecarga ou atividade física excêntrica, ocorre aumento da produção de IGF-1, pois já se sabe que suas principais funções no músculo são de hipertrofia ou regeneração muscular, através da proliferação de células satélite (HAWKE e GARRY, 2001; McKay *et al*, 2008).

Um estudo produzido por Chakravarthy *et al* (2000), mostra que a administração de IGF-1 intramuscular em animais senis e lesionados aumenta a capacidade proliferativa de crescimento das células satélite e por consequência promove aumento de massa muscular.

IGF-1 utiliza várias vias de sinalização para promover a regulação do *pool* de células satélite, dentre elas está calcineurina/NFAT, MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e PI-3K (*phosphatidylinositol-3-OH kinase*) (HAWKE e GARRY, 2001).

Em resumo, IGF-1 é particularmente importante para o tecido muscular, dado que em vários tipos de injúria, durante o crescimento de miofibras existentes ou formação de novas, seus níveis encontram-se elevados (SCHERTZER & LYNCH, 2006).

O HGF é uma citocina multifuncional descrita primariamente como um mitógeno em hepatócitos adultos, mas já foi identificado como fator ativador crítico em extrato de músculo lacerado, além de já ter sido encontrado na lâmina basal de fibras musculares (HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

O seu receptor *c-Met* já foi localizado nas células satélite e miofibras, ao mesmo tempo em que se mostrou ausente nos fibroblastos adjacentes (HAWKE & GARRY, 2001).

Interessantemente, injeção de HGF diretamente em *tibialis anterior* de camundongos adultos resultou na ativação de células satélite quiescentes na ausência de trauma. Em adição, a incubação de extrato de músculo lacerado com anticorpo anti-HGF, levou o extrato a se tornar incapaz de ativar células satélite, reforçando o papel de HGF como fator ativador crítico (HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

Ainda, a suplementação de HGF através de injeção em bolus ou bombas, resulta em aumento da densidade e tamanho de miofibras após injúria (FLOSS *et al*, 1997).

O óxido nítrico é um fator liberado em resposta a estiramento e dano de fibras *in vitro*, e a inibição da óxido nítrico sintase I (NOS-I) resulta na redução da quantidade de HGF liberado no estresse produzido por estiramento. Implicando em uma função do óxido nítrico na ativação de células satélite (HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

Sendo assim, a expressão de HGF no tecido muscular esquelético é proporcional ao grau de injúria, já que promove seletivamente a ativação e proliferação das células satélite, ao mesmo tempo em que atenua a diferenciação de mioblastos através da inibição dos *MRFs* como *MyoD* e *miogenina* (HAWKE & GARRY, 2001).

Os FGFs por sua vez podem apresentar nove formas diferentes (FGF-1 ao FGF-9), as várias formas foram investigadas e observou-se que somente o FGF-6 é exclusivo do músculo esquelético (FLOSS *et al*, 1997; HAWKE & GARRY, 2001).

Em outros estudos, observou-se que FGF-1, 2, 4, 6 e 9 estimularam a proliferação celular, enquanto que FGF-5, 7 e 8 não apresentaram atividade mitógena. Os investigadores observaram que adição de HGF, FGF-2, 4, 6 ou 9 resultou em aumento sinérgico na população de células satélite. E assim como HGF, FGF também é capaz de atenuar a diferenciação celular (HAWKE & GARRY, 2001).

A superfamília TGF- β (fator de crescimento transformador beta) é composta por cerca de 50 proteínas relacionadas muitas das quais fazem parte de três subfamílias majoritárias: proteínas morfogênicas do osso (BMP), fatores de crescimento e diferenciação celular (TGF- β) e activinas. Esses fatores apresentam várias funções na regulação do crescimento celular, proliferação, diferenciação, adesão, migração e apoptose, cada efeito variando de acordo com o tipo e o contexto celular. A miostatina é uma proteína circulante e também um membro dos fatores de transformação e crescimento β , também é conhecido como GDF-8 e é expresso no tecido cardíaco, adiposo e muscular esquelético, especificamente nesse último funciona como regulador negativo do crescimento tecidual, tanto que a superexpressão sistêmica de miostatina leva a uma síndrome de enfraquecimento caracterizada por perda de massa total em 30%, dos quais 35 a 50% representam perda de massa muscular (HAWKE & GARRY, 2001; KOLLIAS & MCDERMOTT, 2008; MCFARLANE, 2007; PATEL & AMTHOR, 2005; TOBIN e CELESTE, 2005; WEHLING *et al.*, 2000; WHITTEMORE *et al.*, 2003).

A importância da miostatina como regulador da massa muscular esquelética foi bem estabelecida primeiramente em camundongos nulos para sua expressão e subsequentemente em gado Belga Azul, em que ambos apresentam hipertrofia e hiperplasia muscular duas a três vezes maiores do que de um animal que apresentava a proteína, através da ativação das células satélite e fusão com fibras pré-existentes, e nos camundongos *knockout* uma porcentagem de tecido adiposo 40% menor (FEDORUK & RUPERT, 2008; WEHLING *et al.*, 2000; WHITTEMORE *et al.*, 2003).

Ainda estudos realizados por Mcfarlane *et al.* (2007) demonstram que o gene *Pax7* tem sua sinalização influenciada pela miostatina, a adição de miostatina exógena em culturas de células reduziu a expressão de *Pax7* dramaticamente. Em contraste o bloqueio funcional ou a completa inativação da miostatina aumentou a expressão de *Pax7*. O que condiz com Joulia *et al.* (2003) que afirma a influência negativa da miostatina na proteção contra apoptose.

Na via de sinalização da miostatina, ela pode se ligar ao receptor de ativina do tipo IIA ou IIB (ActRII), receptor de TGF- β tipo I (T β RI/ALK-5) ou ALK-4 do tipo I, o que leva à ativação de Smad2 e Smad3 seguida de oligomerização com Smad4, assim o complexo Smad2/3/4 se transloca para o núcleo e regula a transcrição de genes como os fatores de transcrição miogênicos (*MyoD*, *Myf5*, *miogenina* e *MRF-4*) e os MEF2A-D (Myogenic Enhancer Factor 2). Recentemente Liu *et al.* (2004) demonstrou que Smad3 é o principal responsável pelo bloqueio da ativação transcricional dos fatores bHLH interferindo principalmente na dimerização de *MyoD* com as proteínas E e a ligação do seu complexo com a região E-box (KOLLIAS & MCDERMOTT, 2008).

Durante o processo inflamatório crônico, como no caso de animais com doença renal crônica, ocorre um aumento de duas a três vezes da expressão do RNAm de miostatina no músculo, fato que pode ser compatível com a suposição de que esse aumento seja diretamente dependente da via NF- κ B que é um fator regulatório chave para o processo de inflamação, e uma sequência consenso no promotor da miostatina já foi localizada. Assim o aumento da expressão de NF- κ B, causado pelo processo inflamatório crônico, levaria a um aumento de expressão de TNF- α , que por sua vez aumentaria a expressão da miostatina e que através das vias MEK1/2 e p38MAPK estimularia a liberação de IL-6, que tem ação inibitória da via de IGF-1 e terminaria por resultar em aumento das taxas de degradação e diminuição das taxas de síntese protéica (PEAKE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011).

Como todos os componentes macromoleculares de um organismo, as proteínas se encontram em um estado dinâmico de síntese e degradação. Durante a proteólise, ligações peptídicas que ligam aminoácidos são hidrolisadas e os aminoácidos são liberados. O processo é realizado por um grupo de enzimas chamadas de proteases (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2001).

As proteínas estranhas dietárias são degradadas no lúmen do trato gastrointestinal e para evitar a ativação de uma resposta imunológica, são absorvidas somente na forma de aminoácidos não antigênicos (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2001).

Proteínas de antígenos próprios podem ser classificadas em dois grupos: extracelulares e intracelulares. As proteínas extracelulares são degradadas através da via sistema endossômico lisossômico, de maneira não específica e com taxas semelhantes, as intracelulares são degradadas por mecanismos totalmente distintos, já que apresentam tempos de meia-vida diferentes que variam de alguns minutos (p53) até dias (actina e miosina) (GLICKMAN & CIECHANOVER, 2001).

Levando em consideração ainda, que as taxas de reciclagem de proteínas extracelulares representam apenas uma pequena fração do total de proteínas recicladas no corpo. Por exemplo: a albumina representa a maior massa de proteínas extracelulares no corpo, e sua reciclagem é de aproximadamente apenas 0.15g/kg/dia (semelhante à hemoglobina) (SCHWARTZ & CIECHANOVER, 2008).

Dessa maneira a reciclagem de proteínas celulares representa a maior parte da massa de reciclagem de proteínas do organismo todo (SCHWARTZ & CIECHANOVER, 2008).

Uma das principais vias de degradação de proteínas celulares é a via ubiquitina-proteassomo, que consiste em vários componentes que devem agir em combinação. O sistema mais bem estudado envolve dois passos importantes: a ligação covalente de múltiplas

moléculas de ubiquitina no substrato-alvo, e a degradação da proteína alvo pelo complexo proteassomo 26S (LECKER *et al*, 1999; SCHWARTZ & CIECHANOVER, 2008).

Para isso é necessário que ocorra um mecanismo em cascata de três etapas: (1) inicialmente a enzima E1 utiliza ATP para ativar a ubiquitina, (2) uma das várias enzimas E2 transfere a ubiquitina ativada para a enzima E3-ligase, (3) por fim a E3-ligase catalisa o último passo do processo de conjugação, a ligação covalente da ubiquitina ao substrato (LECKER *et al*, 1999; SCHWARTZ & CIECHANOVER, 2008).

Assim a cadeia de poliubiquitina serve como marcador de reconhecimento para o proteassomo 26S (um complexo 20S e dois complexos 19S), que finalmente degrada a proteína alvo e libera os aminoácidos livres e também as moléculas de ubiquitina a serem reutilizadas (LECKER *et al*, 1999; SCHWARTZ & CIECHANOVER, 2008).

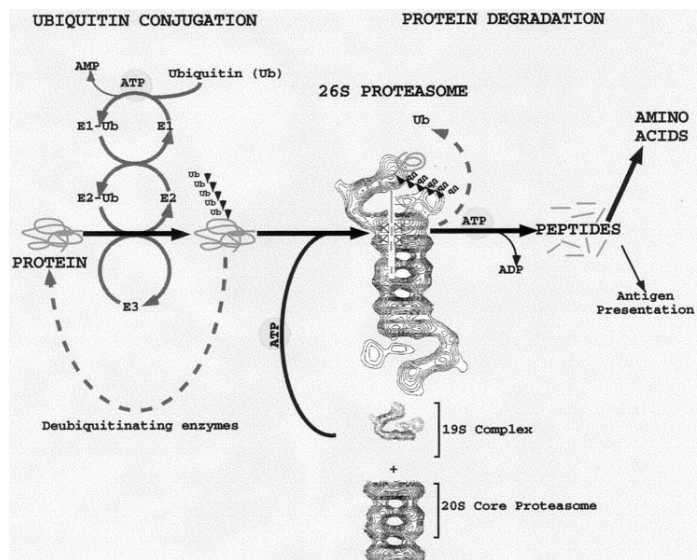


Figura 7 – A via de degradação proteica ubiquitina-proteassomo. Ub = ubiquitina.
Fonte: Adaptado de Lecker et al, 1999.

Uma das principais causas da perda excessiva de massa muscular seria devido a um desequilíbrio que ocorre entre as taxas de síntese e degradação protéica. A via ubiquitina proteassoma é responsável por grande parte da degradação do músculo esquelético (BALTGAVIN *et al*, 2009). Sendo que a perda de funcionalidade muscular em condições agudas e crônicas levam à perda de mobilidade e força, e em adição a doenças metabólicas, pode ter consequências letais (KHARRAZ *et al*, 2013).

Suas enzimas se mostram mais expressas e ativas em processos de atrofia em condições patológicas (câncer, sepsis, diabetes, uremia, desnervação e imobilização a longo prazo) e seus dois marcadores mais comuns são: *Atrogin-1/MAFbx* (*Muscle atrophy F-box*) e *MuRF1* (*Muscle-specific RING finger 1*), ambas E3 ligases músculo específicas (SENF *et al*, 2008; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2001).

As proteínas alvo de ubiquitinação de *Atrogin-1* ainda são desconhecidas, mas evidências indicam que um de seus principais alvos é MyoD. Já *MuRF1* ubiquitina e degrada

a troponina I, MHC (cadeia pesada de miosina), Nedd4 e Notch1, sendo que a MHC é a que possui maior significância funcional na contratura (SENF *et al*, 2008).

2.4 – Serpentes do gênero *Bothrops* e acidente ofídico

Envenenamento resultante de picadas de serpentes representa um problema de saúde pública em várias regiões do mundo que afeta primariamente residentes rurais, mais especificamente nas regiões tropicais e subtropicais (GUTIERREZ *et al*, 2006; GUTIERREZ *et al*, 2013).

Estimativas conservadoras indicam que aproximadamente 5 milhões de pessoas são acometidas no mundo todo ano, o que leva a uma faixa de 25.000 – 125.000 mortes, enquanto que outras 400.000 pessoas terminam com déficits funcionais ou deficiência permanente (GUTIERREZ *et al*, 2013).

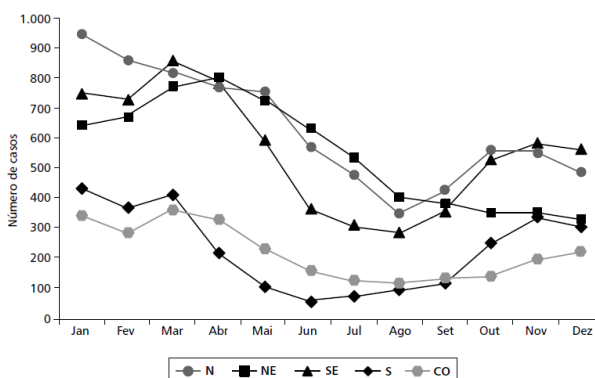
Infelizmente esse problema tem recebido pouca atenção das autoridades públicas, governos e indústria farmacêutica, podendo ser considerado uma das maiores doenças negligenciadas do século XXI (GUTIERREZ *et al*, 2006; GUTIERREZ *et al*, 2013).

Tendo esses dois fatos como pressuposto pode-se considerar o envenenamento por serpentes peçonhentas como uma verdadeira doença ocupacional e ambiental que exacerba a situação de pobreza dessas comunidades (GUTIERREZ *et al*, 2006; GUTIERREZ *et al*, 2013).

A incidência de acidentes ofídicos varia de acordo com o clima, especialmente em períodos que apresentam precipitação e temperatura intensas, o que acaba por coincidir com os ciclos de atividade agrícola. Além disso, os grupos mais afetados por acidentes ofídicos são trabalhadores rurais jovens do sexo masculino (GUTIERREZ *et al*, 2006).

Segundo Bochner & Struchiner (2003), as maiores taxas de incidência são registradas entre os meses de Novembro a Abril (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região. Brasil, 2008.
Fonte: Adaptado de SVS/MS



No Brasil, aproximadamente 90% dos casos de acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (VOMERO *et al*, 2009). Bochner & Struchiner (2003) apresentaram uma tabela resumida (Tabela 1) com o perfil dos indivíduos acometidos por acidentes ofídicos o Brasil, que continua inalterado nos 100 últimos anos.

Variáveis	Perfil epidemiológico
Indivíduo	
Vítima	Homem
Sexo	Masculino
Idade	15 a 49 anos
Profissão/Ocupação	Lavrador
Evento	
Zona	Rural
Local de ocorrência	Campo
Mês do acidente	Novembro a abril
Trimestre do acidente	1a e 4a
Horário do acidente	Diurno
Circunstância do acidente	Trabalho
Local da picada	Membros inferiores
Animal peçonhento	Serpente
Gênero	<i>Bothrops</i>
Espécie	<i>Bothrops jararaca</i>

Tabela 1 – Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos. Fonte: Adaptado de Bochner & Struchiner, 2003.

A *Bothrops jararacussu* está entre as serpentes mais temidas do Brasil, Bolívia, Paraguai e da Argentina (MILANI *et al*, 1997). Está também entre as maiores, mais pesadas e mais temidas serpentes que habitam a América do Sul dentro da família *Viperidae*, podendo chegar até a 2,2 metros de comprimento, consequentemente é a que produz maior quantidade de veneno, tendo a média variando entre ± 250 mg, e excepcionalmente até 1000 mg (peso seco) (MILANI *et al*, 1997); sua dentição Solenóglifa lhe permite injetar grande volume de veneno em suas vítimas (CORREA-NETTO *et al.*, 2010).

Figura 8 – **a.** *Bothrops jararacussu* com mais de 1 metro de comprimento encontrada no estado de São Paulo. **b.** Dentição solenóglifa mostrando as presas inculadoras de veneno. Fonte: Adaptado de Milani et al, 1997.



Essa espécie pode ser encontrada em florestas tropicais, charcos, e margens de rios no Brasil, desde o Rio Grande do Sul, em várias ilhas (Ilha Comprida, Cananéia, Ilha de São Sebastião e Ilha do Cardoso), no Sul da Bolívia, do Paraguai e Nordeste da Argentina (MILANI *et al*, 1997).

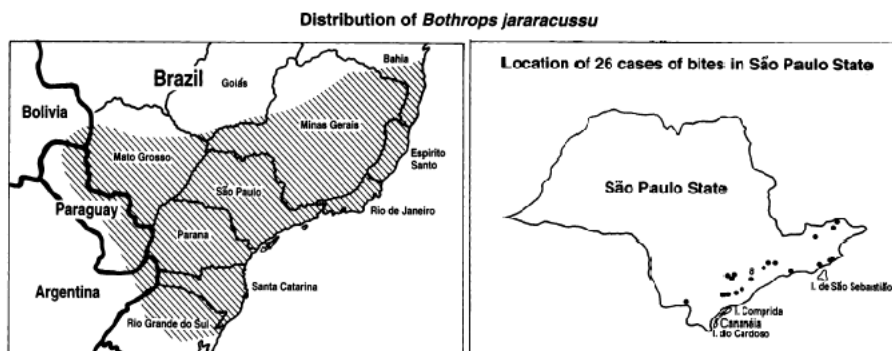


Figura 9 – A esquerda, distribuição das serpentes *Bothrops jararacussu* no Brasil. A direita, distribuição de 29 casos de acidentes no estado de São Paulo. Fonte: Adaptado de Milani *et al*, 1997.

A análise do transcriptoma da glândula de veneno da *Bothrops jararacussu* revelou que 58% dos transcritos representam PLA₂ e outra análise proteômica revelou que seu veneno apresenta de 15 a 25% de concentração de fosfolipase A2 (PLA₂) (CORREA-NETTO *et al*, 2010; GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003).

As PLA₂ mais presentes nos venenos dos viperídeos são as de classe II e as alterações ultra-estruturais e histológicas do efeito dessas PLA₂ no músculo esquelético incluem: rompimento da membrana plasmática, formação de lesões em delta, áreas de degeneração em forma de cunha na periferia das miofibras, hipercontração dos miofilamentos, inchaço e rompimento da membrana mitocondrial, rompimento de membrana de sistemas intracelulares (retículo sarcoplasmático e túbulos T) e picnose do núcleo (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003, VOMERO *et al*, 2009).

Miotoxicidade sistêmica causada por veneno de *Bothrops jararacussu* pode causar mioglobinúria e falência renal aguda, mas raramente ocorre (CORREA-NETTO *et al*, 2010; GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003; TIDBALL *et al*, 1999; TIDBALL, 2005; VOMERO *et al*, 2009), nesses casos a OMS (1981) recomenda a soroterapia como forma de tratamento, cuja função é neutralizar o veneno circulante e assim eliminar os efeitos tóxicos sistêmicos (NUCHPRAYOON & GARNER, 2009). O número de ampolas e o tipo de soro varia de acordo com a gravidade do acidente (quadro 1).

Acidentes	Soros	Gravidade	Nº ampolas
Botrópico	Antibotrópico (SAB)	Leve: quadro local discreto, sangramento em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação	2 a 4
	Antibotrópico-laquético (SABL)	Moderado: edema e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação	5 a 8
		Grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão, anúria	12

Quadro 1 – Número de ampolas de soro antiofídico indicado de acordo com a gravidade do acidente.
Fonte: Adaptado de SVS/MS.

Apesar da soroterapia ser eficiente em neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento, ela é ineficaz para impedir o desenvolvimento dos efeitos locais. O edema e a resposta inflamatória caracterizada pela liberação por neutrófilos e macrófagos de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , é acompanhada por necrose cutânea e/ou mionecrose local do músculo que pode levar à amputação ou levar à déficit funcional do membro (CORREA-NETTO *et al.*, 2010; GUTIERREZ & OWNBY, 2003; TIDBALL *et al.*, 1999; TIDBALL, 2005; VOMERO *et al.*, 2009).

18000 acidentes botrópicos ocorrem anualmente, sendo que a letalidade fica em apenas cerca de 0,3% dos casos e os locais mais cometidos são os pés e as pernas, representando 70,8% de todos os casos (BONI *et al.*, 2011).

3 - JUSTIFICATIVA

Como sabemos em casos de envenenamento por *Bothrops jararacussu* os efeitos sistêmicos quando presentes podem ser tratados com o soro antiofídico, mas efeitos locais são geralmente irreversíveis acarretando em seqüelas como perda de massa muscular devido à mionecrose, podendo ter como consequência atrofia do membro atingido e incapacitação. A miostatina (TGF- β) e sua via de sinalização se apresentam de extrema importância na modulação da força e massa do músculo esquelético, assim como a via de degradação protéica ubiquitina-proteassoma.

Portanto a proposta desse estudo foi caracterizar a expressão dos fatores de transcrição MyoD, miogenina, gene da miostatina, Atrogin-1 e MuRF-1 (ubiquitina-proteassomo) no músculo esquelético de camundongo após intoxicação do veneno de *Bothrops jararacussu*, assim como suas miotoxinas isoladas.

4 – OBJETIVOS

4.1 – Geral

O objetivo desse estudo foi caracterizar o padrão de expressão das proteínas *MyoD*, *miogenina*, *Miostatina*, *Atrogin-1* e *MuRF-1* (via ubiquitina-proteassomo) no tecido muscular esquelético de camundongos após a injeção de veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e bothropsinas 1 e 2 isoladas.

4.2 – Específicos

- Análise qualitativa de expressão proteica através de marcações feitas com a técnica de imunohistoquímica para as proteínas: *MyoD*, *miogenina*, *Miostatina*, *MuRF-1* e *Atrogin-1*.
- Análise quantitativa de expressão proteica através da técnica de *Western Blot* para as proteínas: *MyoD*, *miogenina*, *Miostatina*, *MuRF-1* e *Atrogin-1*.
- Análise e detecção de possíveis alterações no padrão de marcha dos animais entre o período pré-lesão e os diferentes períodos pós-lesão (3, 24, 48, 72 e 96 horas).
- Interpretar os dados obtidos visando observar o padrão e distribuição de expressão gênica e criar uma hipótese que relacione os fatores de transcrição *MyoD* e *miogenina* com o gene da *Miostatina*, assim como também atribuir uma possível função para a via ubiquitina-proteassomo no modelo de envenenamento por *Bothrops jararacussu*.

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Instituto de Biologia/IB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, sob o número de protocolo 3291-1. Foi utilizado total de 135 camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos adulto-jovens (6-8 semanas de idade) com massa corporal média de $22-25 \pm 3\text{g}$, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP, Campinas - SP e da ANILAB (Animais de Laboratório), Paulínia - SP.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas padrão em número de cinco animais cada, onde permaneceram em temperatura ambiente controlada (18 a 20°C), com livre acesso à alimentação padrão (ração Purina), água *ad libitum* e ciclo de iluminação controlado de “12 horas claro” e “12 horas escuro”. Inicialmente os animais foram identificados e divididos entre os diferentes grupos experimentais de maneira randomizada.

Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com ketamina e xilazina (100mg/kg e 20mg/kg, respectivamente), sendo este procedimento seguido por deslocamento cervical. Todos os procedimentos foram realizados obedecendo ao padrão internacional de manipulação animal.

5.2 – Modelo de envenenamento

O veneno bruto liofilizado de *Bothrops jararacussu* foi doado pelo Professor Dr. José Carlos Cogo (Univap – Universidade Vale do Paraíba), e estocado à -20°C e diluído em solução salina estéril 0,9% imediatamente antes do uso.

Nos grupos tratados com veneno (*Bjussu*), dose única de 1mg/kg foi injetada via intramuscular na porção média do músculo gastrocnêmio direito.

As bothropstoxinas 1 e 2 fracionadas a partir do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foram doadas pelo Professor Dr. Sérgio Marangoni (Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual – Instituto de Biologia / Unicamp), e estocadas à -20°C e diluídas em solução salina estéril 0,9% imediatamente antes do uso.

Nos animais tratados tanto com bothropstoxinas 1 (*BthTx-I*) quanto 2 (*BthTx-II*), foi administrada dose única de 2,5mg/kg via intramuscular na porção média do músculo gastrocnêmio direito.

Já os animais dos grupos controle (*Sham*) receberam dose única de 2,5mg/kg de solução salina (*NaCl* 0,9%) no gastrocnêmio direito.

5.3 – Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico Ketamina e Xilazina (100mg/kg; 20mg/kg, respectivamente), através da administração de Dopalen (10%) e Anasedan (2%) via intraperitoneal (Vertbrands, Jacareí, SP, Br.)

5.4 – Descrição dos grupos experimentais

- A. Grupo *Pre-injury*: Os animais deste grupo não sofreram qualquer tipo de lesão e/ou tratamento. Após realização da coleta de dados para análise funcional de marcha os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia para coleta do músculo gastrocnêmio direito.
- B. Grupo *Sham*: Animais de 6-8 semanas, que receberam injeção intramuscular (gastrocnêmio) de solução salina 0,9% e foram sacrificados por aprofundamento de anestesia nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (n = 5).
- C. Grupo *Bjussu*: Animais de 6-8 semanas, que receberam injeção intramuscular (gastrocnêmio) de veneno bruto de *Bothrops jararacussu* na dose de 1 mg/Kg, eluídos em salina 0,9%, e foram sacrificados por aprofundamento de anestesia nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (n = 5).
- D. Grupo *BthTx1*: Animais de 6-8 semanas, que receberam injeção intramuscular (gastrocnêmio) de bothropstoxina 1 na dose de 2,5mg/Kg, eluídos em salina 0,9%, e foram sacrificados por aprofundamento de anestesia nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (n = 5).
- E. Grupo *BthTx2*: Animais de 6-8 semanas, que receberam injeção intramuscular (gastrocnêmio) de bothropstoxina 2 na dose de 2,5mg/Kg, eluídos em salina 0,9%, e foram sacrificados por aprofundamento de anestesia nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (n = 5).

Grupos Experimentais	Amostra
Grupo <i>Pre-injury</i> (intacto)	5
Grupo <i>Sham</i> 3h	5
Grupo <i>Sham</i> 24h	10
Grupo <i>Sham</i> 48h	10
Grupo <i>Sham</i> 72h	10
Grupo <i>Sham</i> 96h	10
Grupo <i>Bjussu</i> 3h	5
Grupo <i>Bjussu</i> 24h	10
Grupo <i>Bjussu</i> 48h	10
Grupo <i>Bjussu</i> 72h	10

Grupo <i>Bjussu</i> 96h	10
Grupo <i>BthTx-1</i> 24h	5
Grupo <i>BthTx-1</i> 48h	5
Grupo <i>BthTx-1</i> 72h	5
Grupo <i>BthTx-1</i> 96h	5
Grupo <i>BthTx-2</i> 24h	5
Grupo <i>BthTx-2</i> 48h	5
Grupo <i>BthTx-2</i> 72h	5
Grupo <i>BthTx-2</i> 96h	5
	135

5.5 – Técnicas de análise

5.5.1 – Imunohistoquímica

Após o tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e seus músculos gastrocnêmios foram coletados e fixados overnight em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1m (pH 7,4).

O material foi incluído em parafina sendo a desidratação realizada com banhos em álcool de diferentes graduações, o clareamento com xilol I, II e III e impregnação com parafina I e II.

Assim o material foi cortado em micrótomo (5µm de espessura), sendo um dos cortes submetido à técnica de coloração Hematoxilina Eosina e os outros à técnica de imunohistoquímica. Para isso foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio (2 ciclos de 10 min) e a recuperação do epítipo, com tampão citrato de sódio 10mM, pH 6,0 em panela a vapor (95-99°C) a 30 min.

A ligação não específica do antígeno foi bloqueada com leite em pó reconstituído (5%) durante 1 hora. As lâminas então foram incubadas com anticorpo primário por 16-18 horas em câmara úmida a 4°C. Após retornar a temperatura ambiente as lâminas foram incubadas em anticorpo secundário por 30 min em TA e a revelação foi feita com DAB (DAB+, Dako Cytomation, CA, USA) e os núcleos contra corados em Hematoxilina de Harris; após desidratação em etanol as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá. Os controles negativos foram feitos substituindo o anticorpo primário por PBS-BSA (albumina sérica bovina) 1%.

5.5.2 – Western Blotting

Animais controle e tratados serão anestesiados e sacrificados por aprofundamento de anestesia, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção de salina (*Sham*), veneno de *Bothrops jararacuçu* (*Bjussu*) e Bothropstoxina I e II (BthTx1 e BthTx2). Os músculos serão extraídos e homogeneizados em um coquetel de extração (10 mM de EDTA, 2 mM PMSF, 200 mM NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de NaVO₄, 10 g de apronitina/ml e 100 mM de TRIS, pH 7,4). O homogenato será centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -80°C.

A concentração das proteínas será determinada com um kit de ensaio protéico BIO-RAD. Alíquotas de proteína (40µg) serão aplicadas a géis de poliacrilamida a 12%. Após SDS PAGE, as proteínas serão transferidas a uma membrana de nitrocelulose por *eletroblotting* e a membrana será bloqueada por 30 minutos a temperatura ambiente em TBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 com 5% de leite desnatado ou 5% de BSA. Os blots serão incubados a 4°C *overnight* com os anticorpos diluídos em solução tampão (TBS plus com 0,1% de Tween 20) contendo 3% de BSA (albumina sérica bovina). As membranas serão subsequentemente lavadas três vezes (5 minutos cada) em solução tampão e então incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com HRP, diluídos em tampão com 1% de leite desnatado ou BSA por 2 horas. Após as lavagens em tampão, os *blots* foram revelados em filme raio-x usando um kit de quimioluminescência. Análises densitométricas serão realizadas usando o software de imagem Image J. Para cada proteína investigada, os resultados serão confirmados em triplicata.

5.5.3 – Análise da função motora dinâmica

Para esta análise foi utilizado o equipamento *CatWalk XT* (Noldus Information Technology® - Holanda), composto por um sistema automatizado para análise da marcha, o qual permite a mensuração de parâmetros estáticos e dinâmicos (WANG *et al.*, 2008).

Dez animais tiveram a marcha analisada, sendo os períodos classificados em: pré-lesão (animais sem tratamento), 3, 24, 48, 72 e 96 horas após lesão e 3, 24, 48, 72 e 96 (*Bjussu*) horas após injeção de salina (*Sham*).

Foi realizada, para cada animal, a quantidade de corridas necessárias até completarem-se três que obedecessem aos parâmetros delimitados no experimento. Cada grupo experimental totalizou 15 corridas para cada um dos períodos (pré-lesão, 3, 24, 48, 72 e 96 horas pós-lesão). As corridas do período pré-lesão serviram para constituir o valor de referência (padrão) de cada animal.

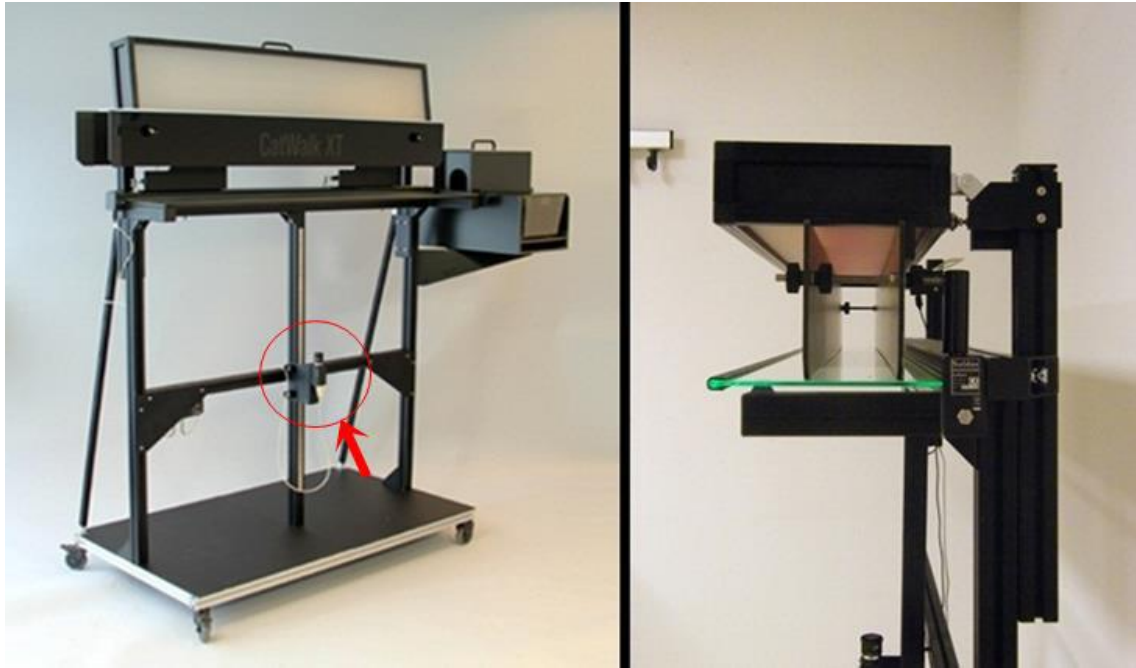


Figura 10 - Sistema *CatWalk* para análise da função motora dinâmica. Vista anterolateral e lateral. Destaque para a câmera digital acoplada sob a passarela. Fonte: Adaptado de www.noldus.com.

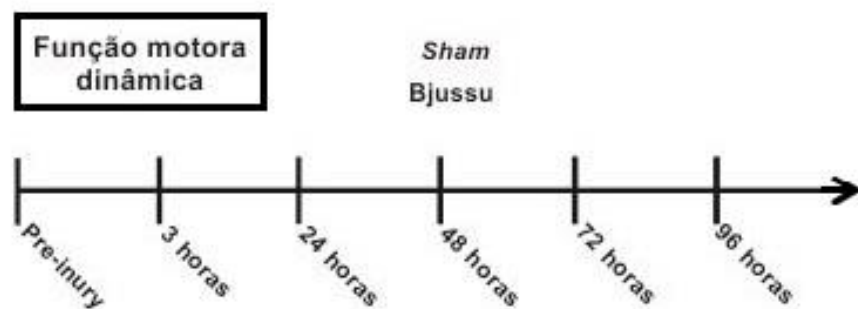


Figura 11 – Períodos de análise da função motora dinâmica. Os cinco animais de cada um dos grupos *Sham* e *Bjussu* passaram por análise desde o período *Pre-injury* (intacto) até 96 horas após injeção.

Sob a passarela há uma câmera digital acoplada, ajustada com ganho de 30,99 e limiar de intensidade 0,15. Para validação dos dados de cada corrida, os animais tiveram que realizar o percurso em um trecho calibrado de 20 X 10 cm, atravessando a passarela de

um lado a outro e obedecendo a alguns parâmetros: tempo mínimo de 0,5 s; tempo máximo de 5 s; variação máxima de velocidade de 40%.

O software *CatWalk XT 9.1*[®] arquivou as corridas que obedeceram às especificações descritas anteriormente. A partir das capturas foram gerados diversos parâmetros estáticos e dinâmicos relativos às quatro patas.

Sendo os parâmetros selecionados para análise:

- Apoio (s): Duração em segundos do contato da pata do animal com a passarela.
- Intensidade máxima: Máximo de intensidade aplicada pelo animal referente a uma pata, considerando o trajeto completo, medida em unidades arbitrárias.
- Velocidade do balanço (cm/s): Velocidade (unidade de distância/ segundo) da pata durante o balanço, seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Velocidade do balanço} = \frac{\text{comprimento da passada}}{\text{balanço}}$$

- Comprimento da passada (cm): Distância (em unidades de distância) entre dois posicionamentos de uma mesma pata. O cálculo deste parâmetro da marcha é baseado nas coordenadas X do centro da pegada de dois posicionamentos sucessivos de uma mesma pata durante o contato máximo, levando em conta o Teorema de Pitágoras (Figura 12):



Figura 12 – Comprimento da passada: distância entre dois posicionamentos sucessivos de uma mesma pata.

Os dados foram transferidos para uma planilha do *Microsoft Excel for Windows*[®] no computador conectado ao equipamento. Foi considerada a média entre as três corridas obtidas de cada animal. Os dados capturados referem-se aos membros posterior esquerdo [controle (LH - *left hind*)] e posterior direito [lesionado (RH - *right hind*)].

5.5.4 – Análise estatística

As análises entre três ou mais grupos experimentais foram submetidas ao teste de variância ANOVA *one-way*, seguido pelo *Tukey's Multiple Comparison Test*. As análises entre apenas dois grupos ou amostras foram realizadas por meio do Teste *T Student* com pós-teste *Bonferroni*.

Para todas as análises, foram considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos. Os testes foram aplicados por meio do programa *GraphPad Prism 5.0*® (GraphPad Software Inc., EUA).

6 – RESULTADOS

6.1 – Análise de expressão protéica com veneno bruto

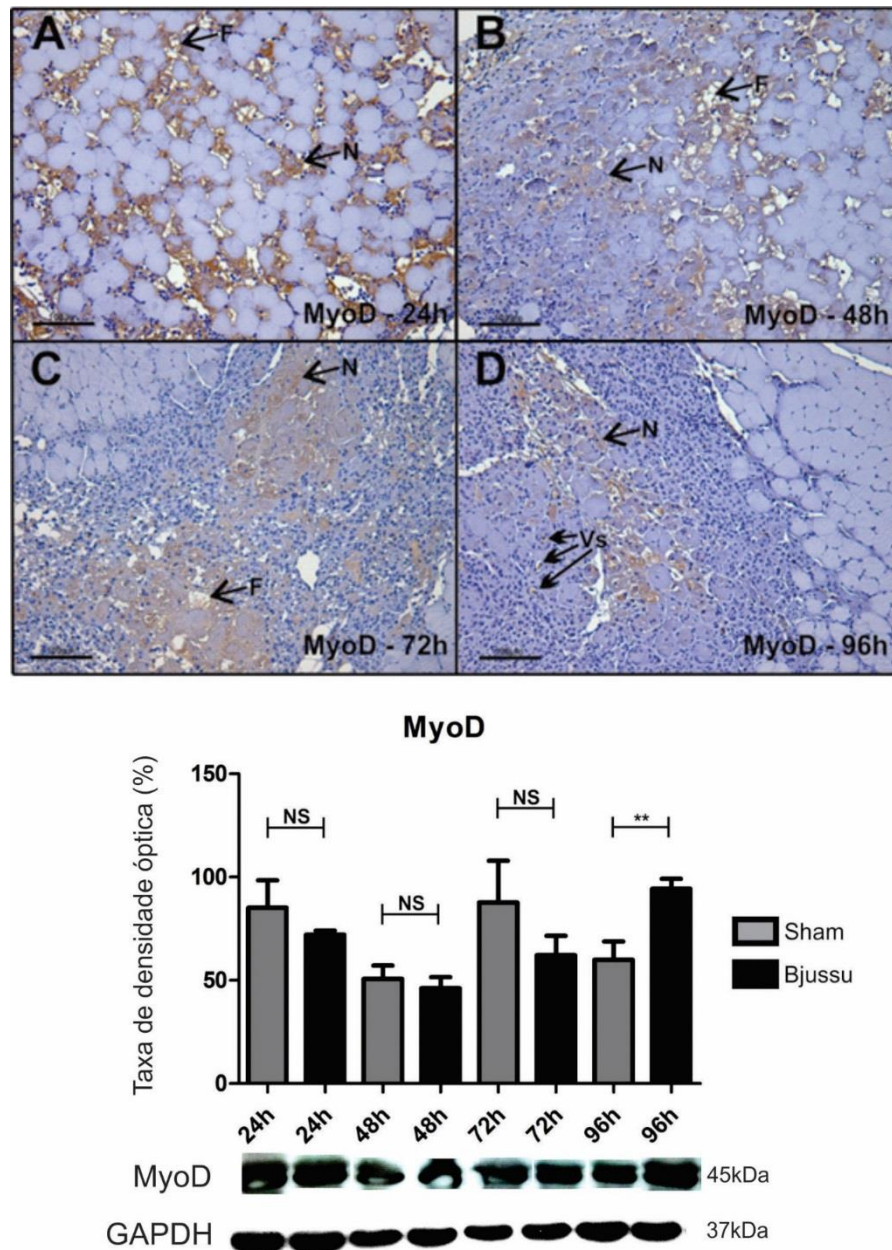


Figura 13: Quadro de figuras ilustrativas dos resultados da imunohistoquímica e *Western Blot* para MyoD. 24, 48, 72 e 96 horas pós tratamento de veneno (1mg/kg – i.m.). **N** = Miofibras necróticas; **F** = Células fantasma; **Vs** = Vasos sanguíneos. Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de MyoD nos diferentes tempos analisados. Significância estatística pelo teste *t*-Student mostrada como * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** para $p \leq 0,001$. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão. (n=5 controle e n=5 *Bjussu* /Tempo).

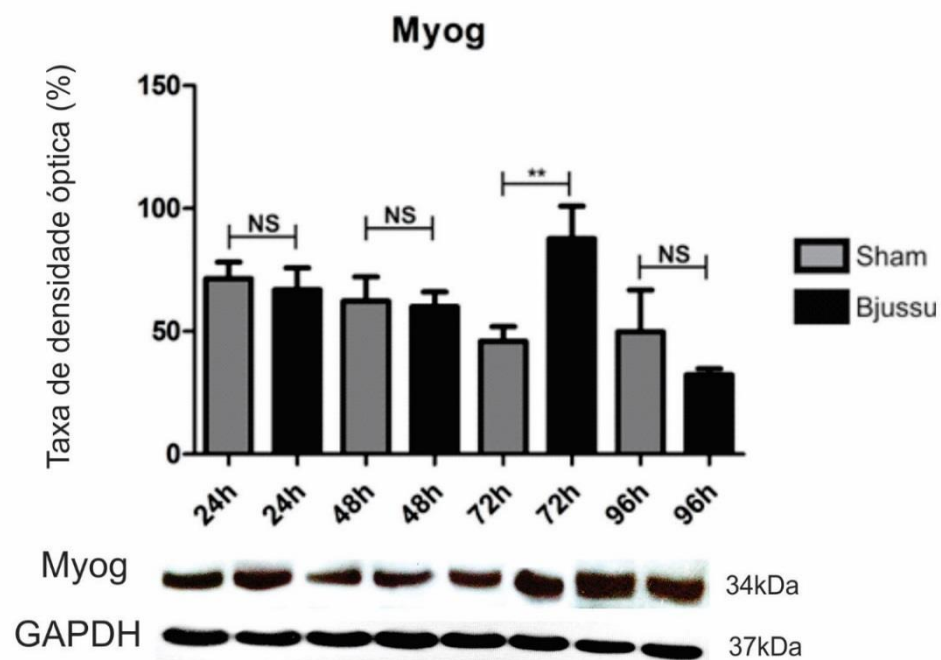
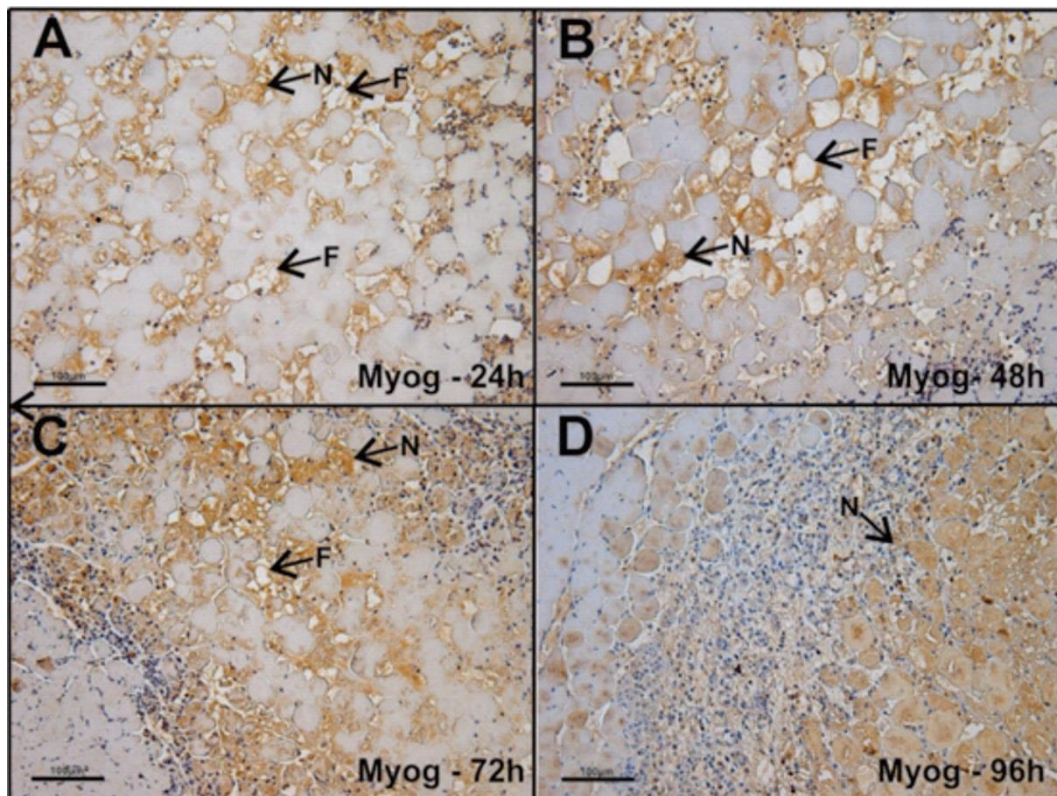


Figura 14: Quadro de figuras ilustrativas dos resultados da imunohistoquímica para Myog. 24, 48, 72 e 96 horas pós tratamento de veneno (1mg/kg – i.m.). **N** = Miofibras necróticas; **F** = Células fantasma. Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de Myog nos diferentes tempos analisados. Significância estatística pelo teste *t*-Student mostrada como * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** para $p \leq 0,001$. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão. (n=5 controle e n=5 *Bjussu* /Tempo).

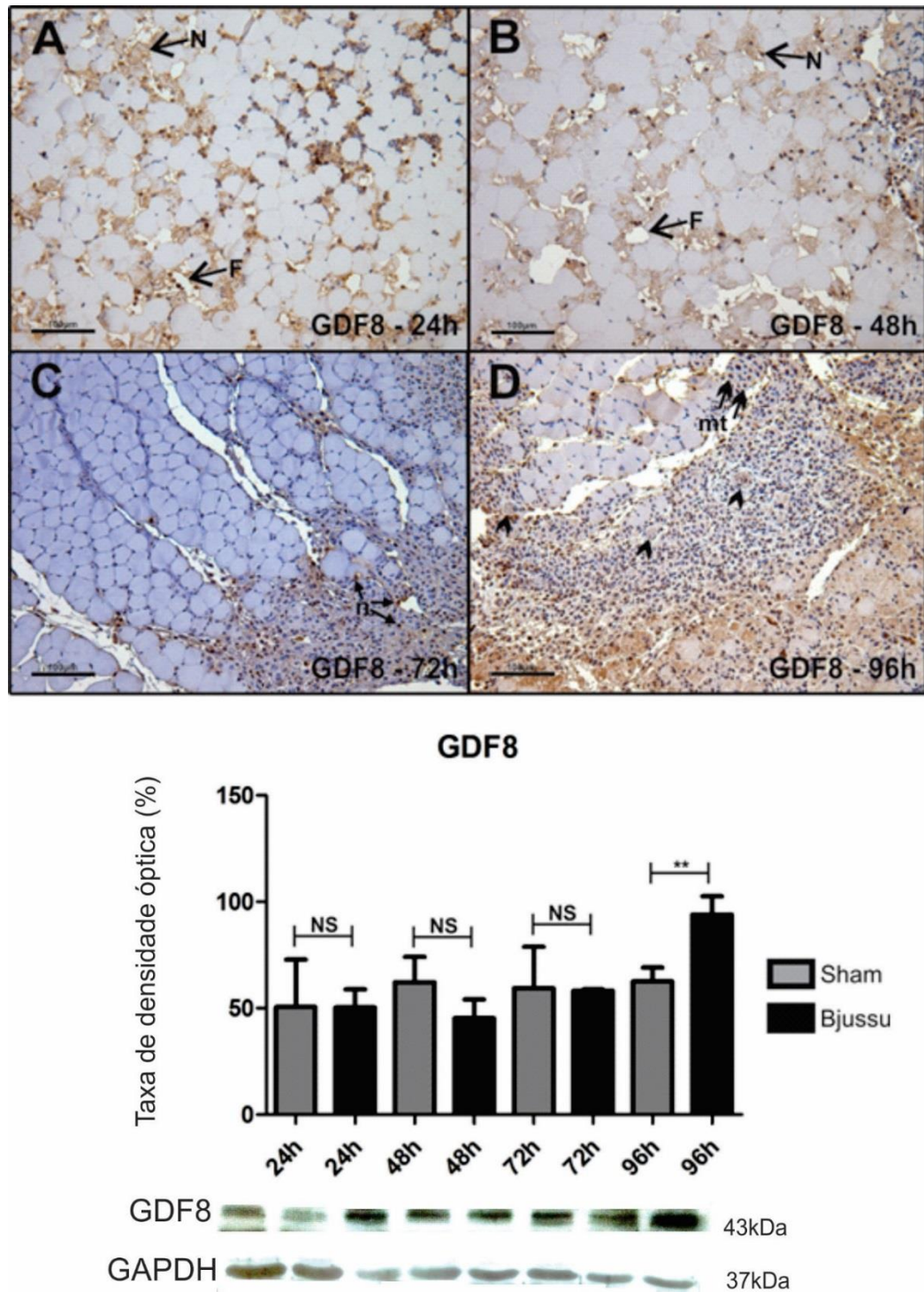


Figura 15: Quadro de figuras ilustrativas dos resultados da imunohistoquímica para GDF-8. 24, 48, 72 e 96 horas pós tratamento de veneno (1mg/kg – i.m.). **N** = Miofibras necróticas; **F** = Células fantasma; **n** = núcleos de células em proliferação; **mt** = miotubos em formação; **cabeças de seta** = Fibras nervosas. Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de GDF-8 nos diferentes tempos analisados. Significância estatística pelo teste *t*-Student mostrada como * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** para $p \leq 0,001$. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão. (n=5 controle e n=5 *Bjussu* /Tempo).

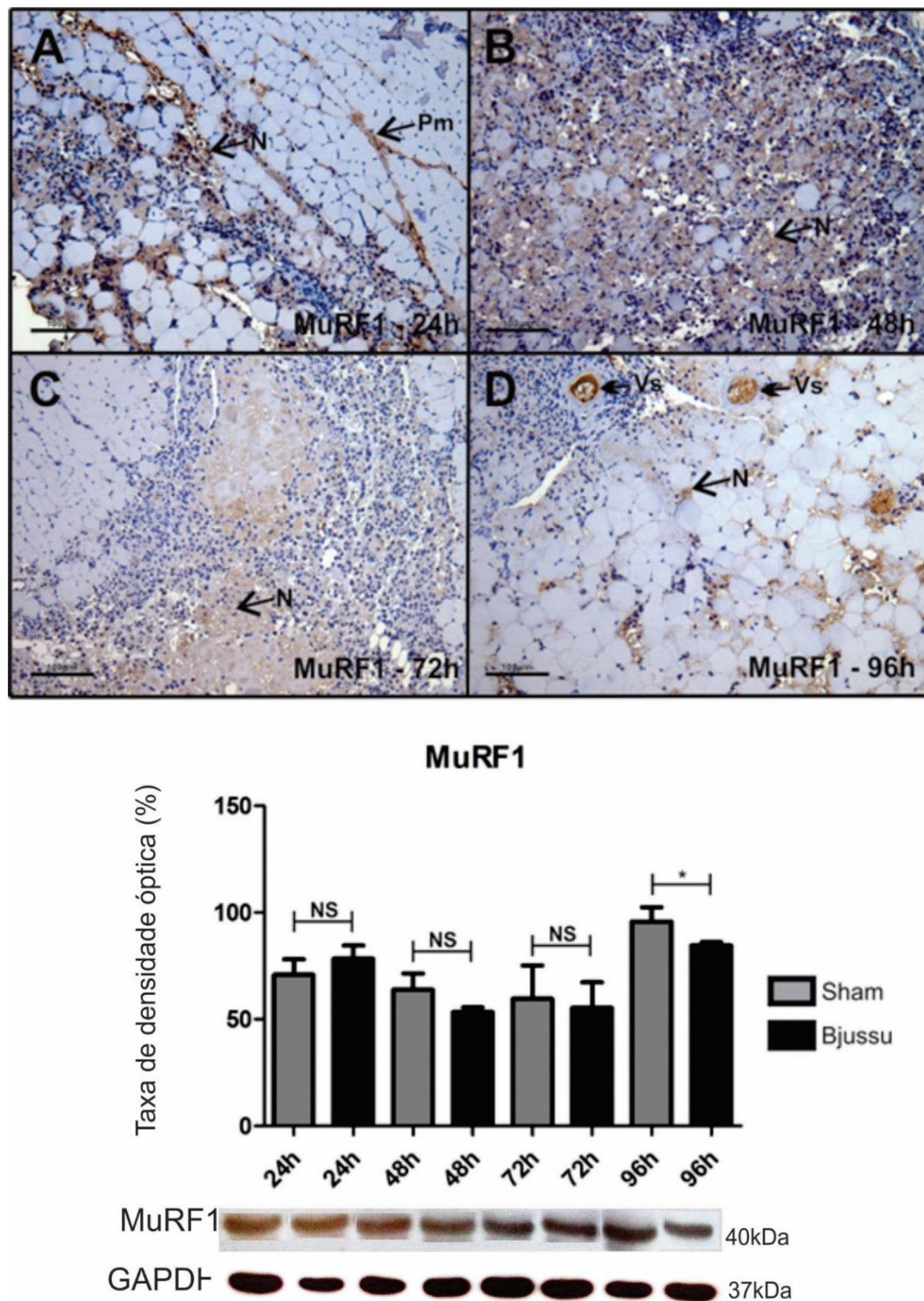


Figura 16: Quadro de figuras ilustrativas dos resultados da imunohistoquímica para MuRF-1. 24, 48, 72 e 96 horas pós tratamento de veneno (1mg/kg – i.m.). **N** = Miofibras necróticas; **Pm** = Perimísio; **Vs** = Vasos sanguíneos. Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de MuRF-1 nos diferentes tempos analisados. Significância estatística pelo teste *t*-Student mostrada como * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** para $p \leq 0,001$. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão. (n=5 controle e n=5 *Bjussu* /Tempo).

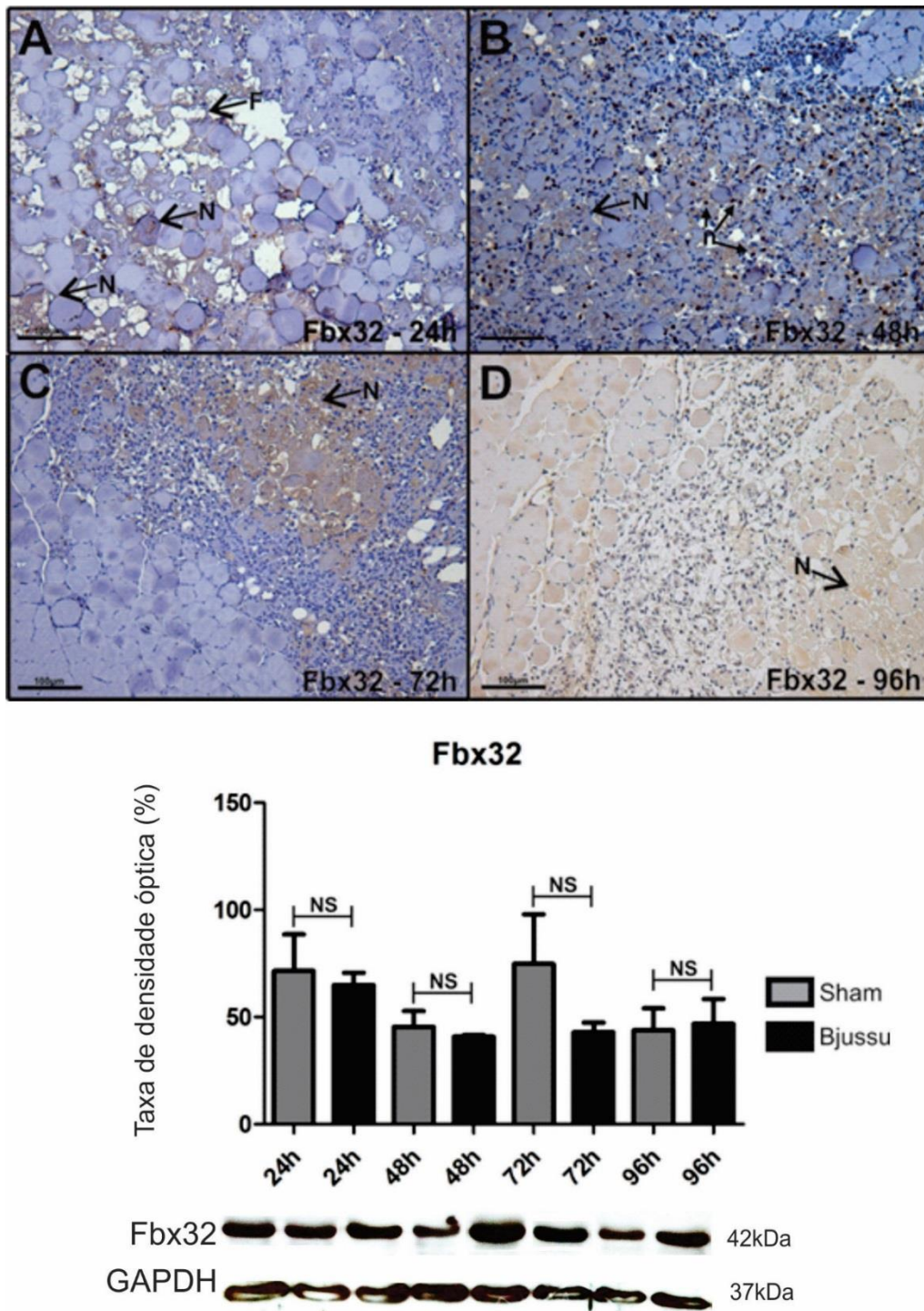


Figura 17: Quadro de figuras ilustrativas dos resultados da imunohistoquímica para Fbx-32. 24, 48, 72 e 96 horas pós tratamento de veneno (1mg/kg – i.m.). **N** = Miofibras necróticas; **F** = Células fantasma; **n** = Núcleos de células em proliferação. Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de Fbx-32 nos diferentes tempos analisados. Significância estatística pelo teste *t*-Student mostrada como * para $p \leq 0,05$, ** para $p \leq 0,01$, *** para $p \leq 0,001$. Dados representam a média $\pm$ desvio padrão. (n=5 controle e n=5 *Bjussu* /Tempo).

MyoD mostrou, no período de 24, 48, 72 e 96 horas, marcação citoplasmática de miofibras em processo necrótico e membranas fantasma. No período de 96 horas também é possível observar marcação no interior de vasos sanguíneos em formação (**Figura 13**).

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de *MyoD* mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de *MyoD* apenas na comparação entre os grupos *Sham 96h* e *Bjussu 96h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento (**Figura 13**).

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para *MyoD* não foi possível detectar diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *Sham*. Por outro lado, no grupo *Bjussu*, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.01$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.05$), **48h vs 96h** ($p \leq 0.001$), **72h vs 96h** ($p \leq 0.01$).

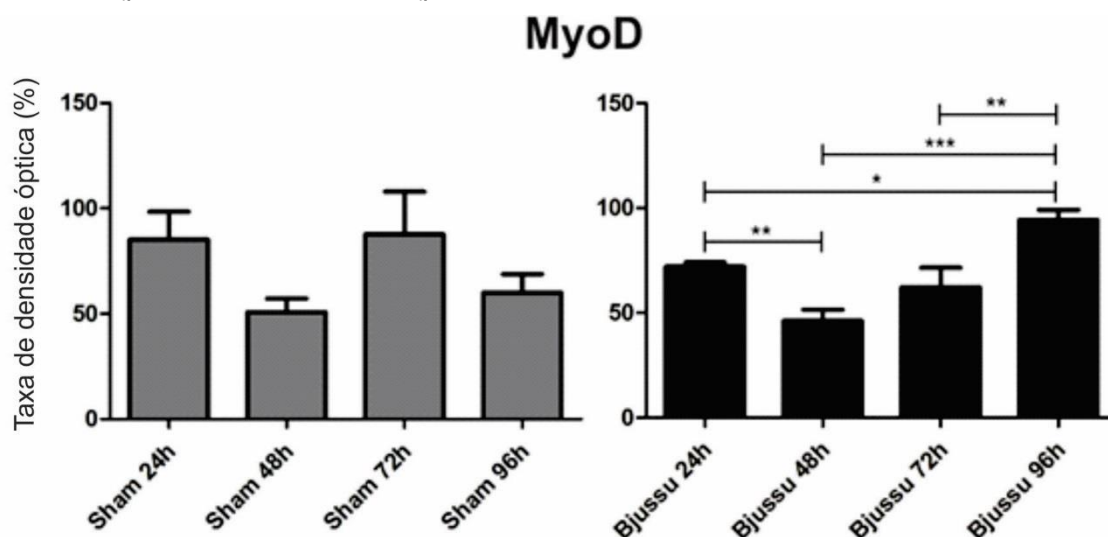


Gráfico 1: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjussu*) (1,0 mg/kg) ou solução salina (*Sham*) (0,9%). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.

Myog apresentou marcação muito semelhante à de *MyoD*, com marcação de fibras necróticas em todos os períodos e em membranas fantasma nos períodos de 24, 48 e 72 horas (**Figura 14**).

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de *Myog* mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de *MyoD* apenas na comparação entre os grupos *Sham 72h* e *Bjussu 72h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento (**Figura 14**).

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para *Myog* não foi possível detectar diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *Sham*. Por outro lado, no grupo *Bjussu*, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os períodos **24h vs 96h** ($p \leq 0.01$), **48h vs 72h** ($p \leq 0.01$), **48h vs 96h** ($p \leq 0.01$), **72h vs 96h** ($p \leq 0.001$).

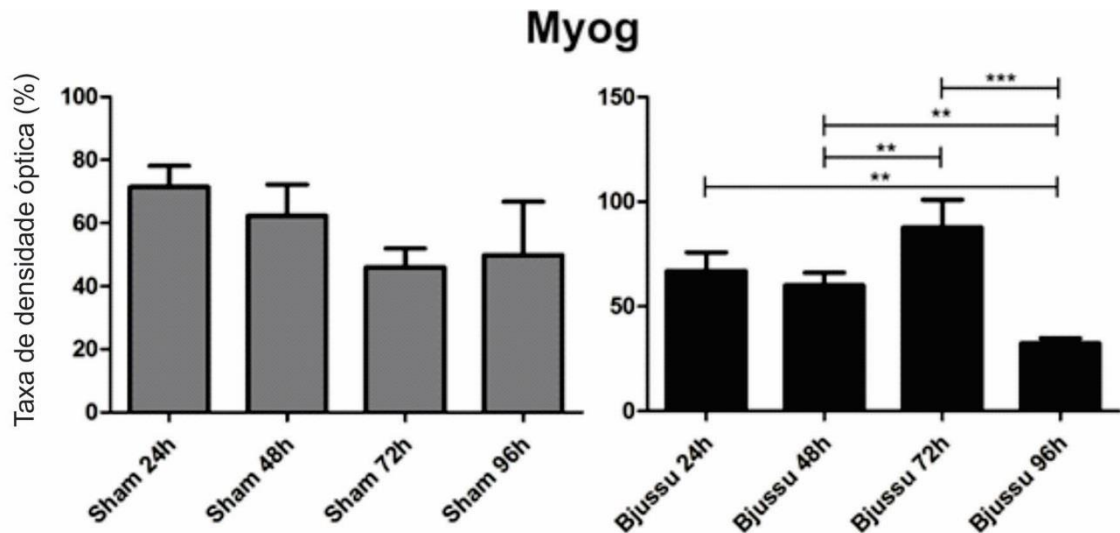


Gráfico 2: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Myog* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjussu*) (1,0 mg/kg) ou solução salina (*Sham*) (0,9%). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.

Nos períodos de 24 e 48 horas, GDF-8 apresentou marcação muito semelhante à de MyoD, localizada em membranas fantasma, miofibras necróticas e citoplasma de mioblastos em proliferação. Já em 72 horas é possível observar a marcação nuclear de células proliferativas. No período de 96 horas pode-se observar imunomarcação em miofibras necróticas, núcleo e citoplasma de miotubos em formação, assim como fibras nervosas em formação (**Figura 15**).

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de GDF-8 mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de GDF-8 apenas na comparação entre os grupos *Sham 96h* e *Bjussu 96h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento (**Figura 15**).

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para GDF-8 não foi possível detectar diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *Sham*. Por outro lado, no grupo *Bjussu*, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os períodos **24h vs 96h** ($p \leq 0.001$), **48h vs 96h** ($p \leq 0.001$), **72h vs 96h** ($p \leq 0.01$).

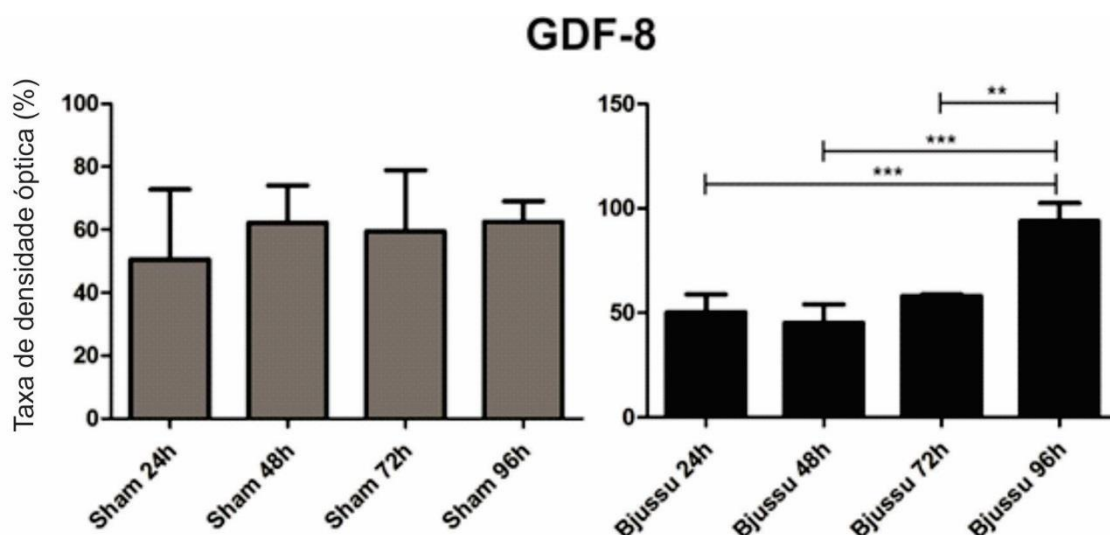


Gráfico 3: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *GDF-8* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjussu*) (1,0 mg/kg) ou solução salina (*Sham*) (0,9%). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.

Para MuRF-1, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, nota-se imunoexpressão localizada em citoplasma de miofibras necróticas e perimísio de regiões intactas. Às 96 horas exclusivamente a imunomarcagem do interior de vasos sanguíneos em formação (**Figura 16**), assim como observado para MyoD (**Figura 13**).

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de MuRF-1 mostrou diferença significativa ($p < 0.05$) na expressão relativa de MuRF-1 apenas na comparação entre os grupos *Sham 96h* e *Bjussu 96h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento (**Figura 16**).

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para MuRF-1 foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *Sham*: **48h vs 96h** ($p \leq 0.05$) e **72h vs 96h** ($p \leq 0.05$).

No grupo *Bjussu*, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.05$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.05$), **48h vs 96h** ($p \leq 0.05$), **72h vs 96h** ($p \leq 0.05$).

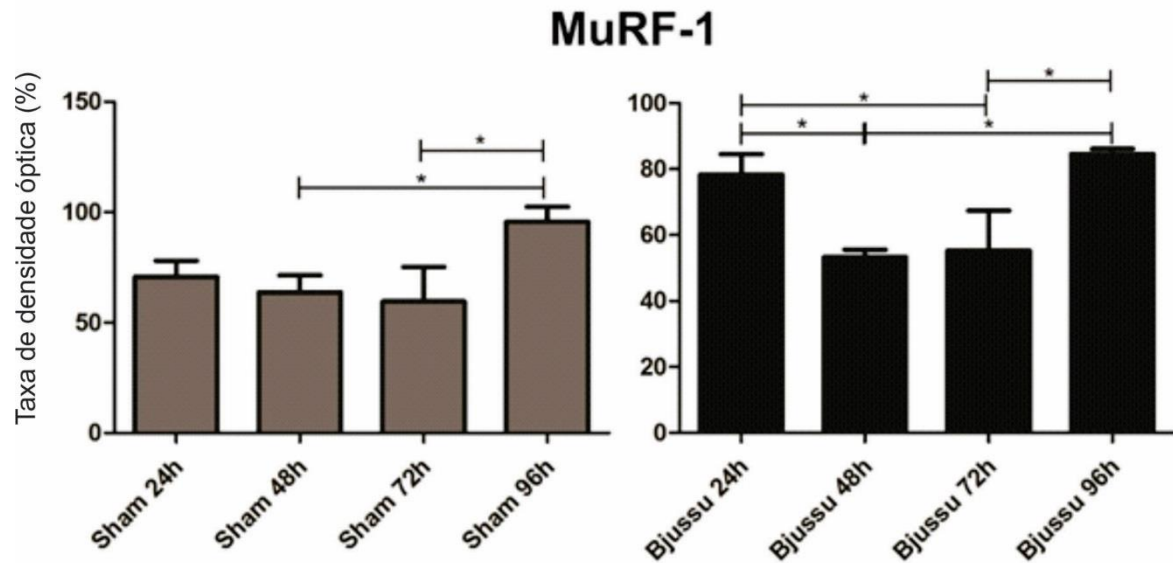


Gráfico 4: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MuRF-1* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjussu*) (1,0 mg/kg) ou solução salina (*Sham*) (0,9%). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.

A proteína Fbx-32, em 24 e 48 horas, mostra leve imunoexpressão em miofibras em processo degenerativo com presença de lesões delta. Às 48 horas também fica evidente a marcação nuclear em células proliferativas. No período de 72 horas não ocorre marcação nuclear, apenas no citoplasma de miofibras em processo degenerativo (**Figura 17**).

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de Fbx-32, demonstrou padrão muito similar na comparação dos grupos *Sham* e *Bjussu* em todos períodos, sem alterações significativas nas análises (**Figura 17**).

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para Fbx-32 não foi possível detectar diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *Sham*. Por outro lado, no grupo *Bjussu*, foram observadas diferenças significativas na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.05$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.05$).

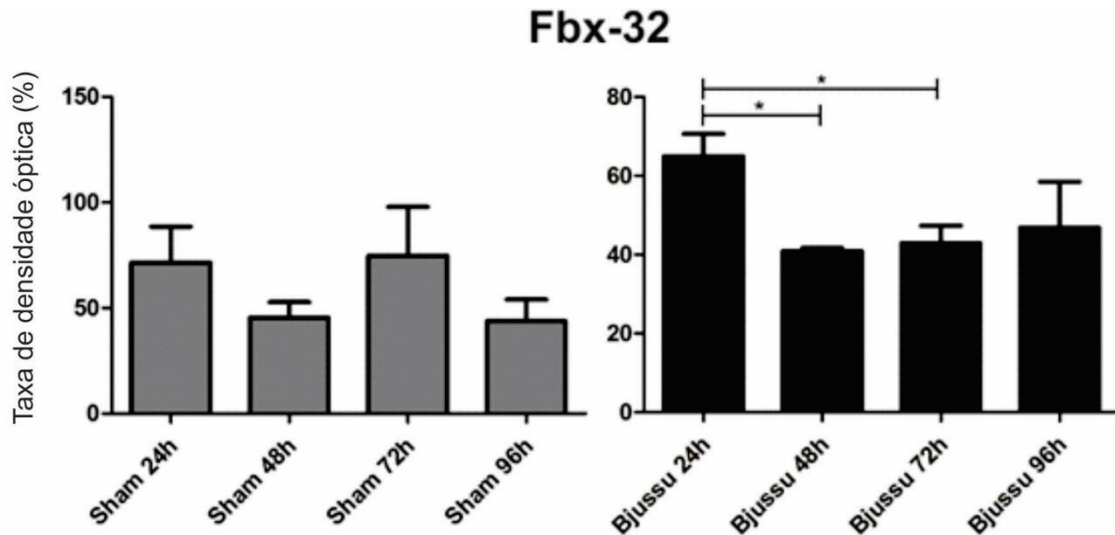


Gráfico 5: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Fbx-32* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de veneno de *Bothrops jararacussu* (*Bjussu*) (1,0 mg/kg) ou solução salina (*Sham*) (0,9%). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.

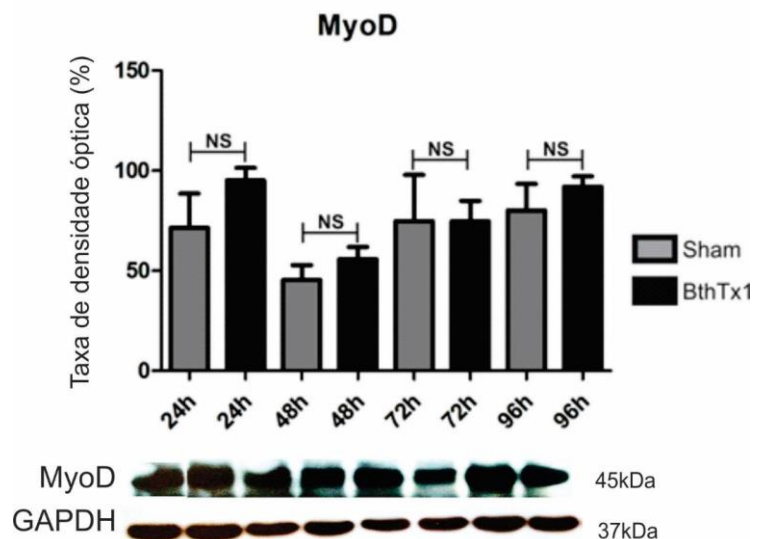
Nos grupos *Sham* não foi observada a marcação de nenhuma das proteínas analisadas acima (não mostrado).

6.2 – Análise de expressão protéica com Bothropsina – 1 (*BthTx-1*)

- MyoD

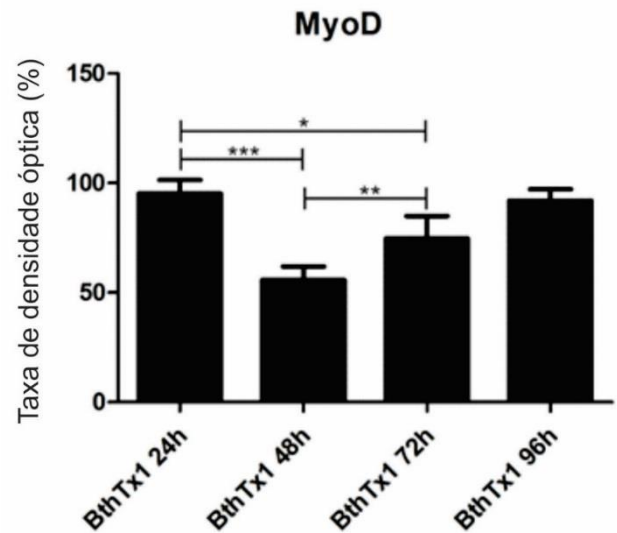
A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de MyoD, demonstrou padrão muito similar na comparação dos grupos *Sham* e *BthTx1* em todos períodos, sem alterações significativas nas análises.

Gráfico 6: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 1 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.



Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para MyoD foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx1* na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.05$), **48h vs 72h** ($p \leq 0.01$).

Gráfico 7: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- *Myog*

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de *Myog* mostrou diferença significativa ($p < 0.001$) na expressão relativa de *Myog* apenas na comparação entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx1 48h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

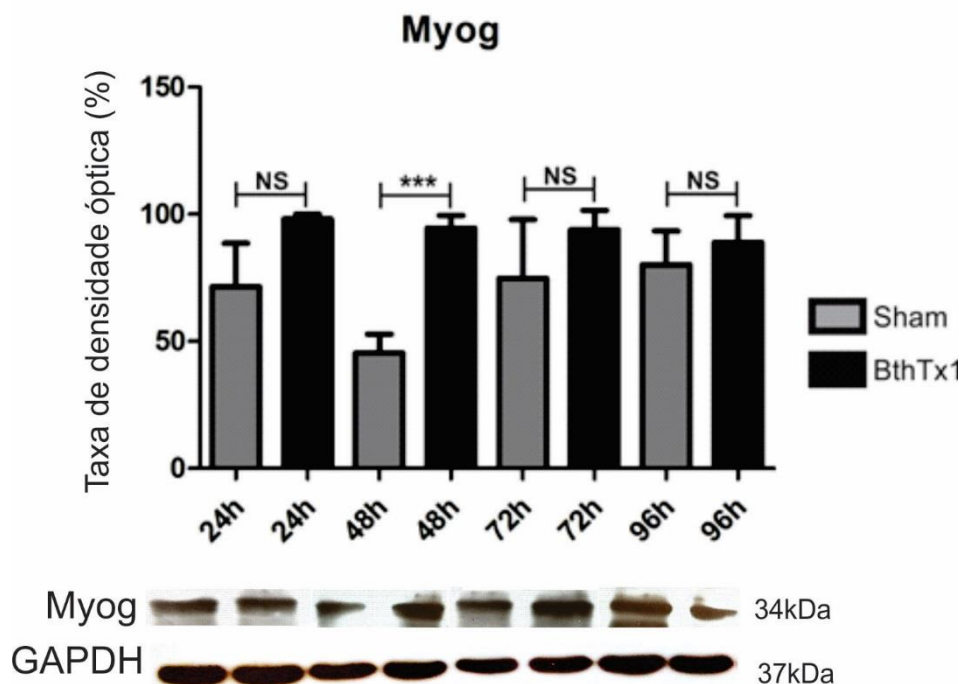
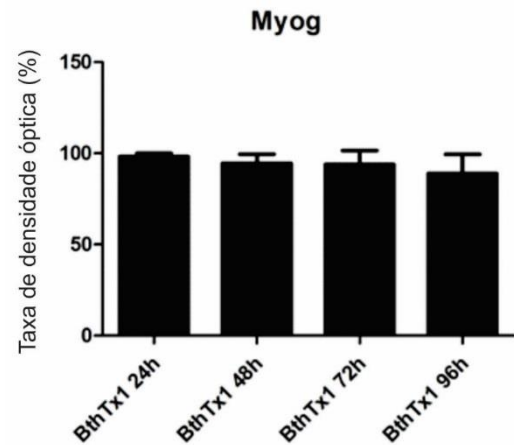


Gráfico 8: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Myog* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 1 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t*

de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste t de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para Myog, não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx1*.

Gráfico 9: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- GDF-8

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de GDF-8 mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de GDF-8 apenas na comparação entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx1 48h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

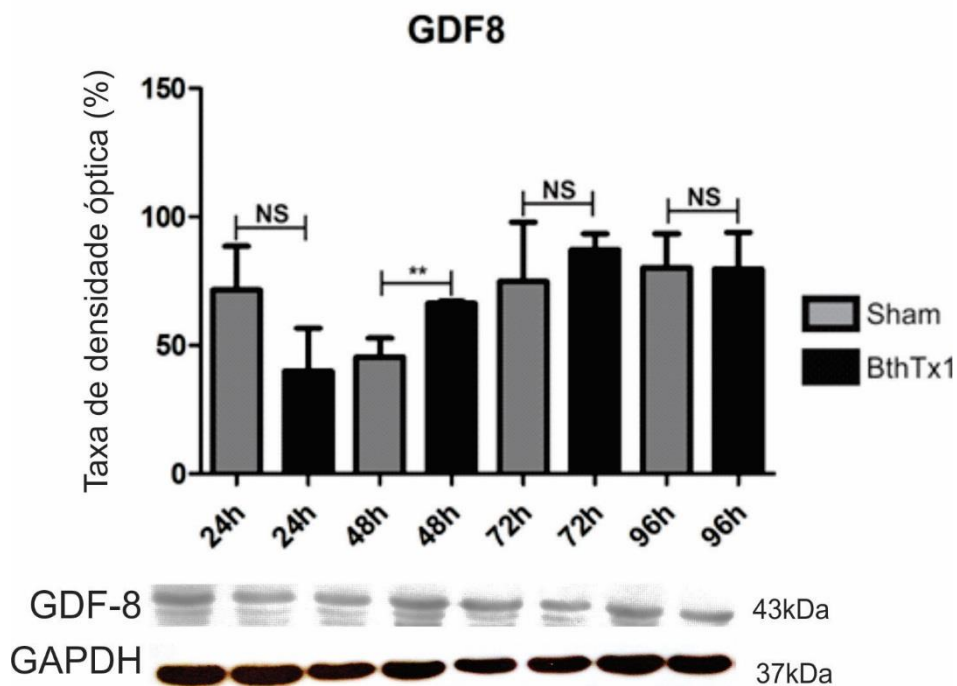
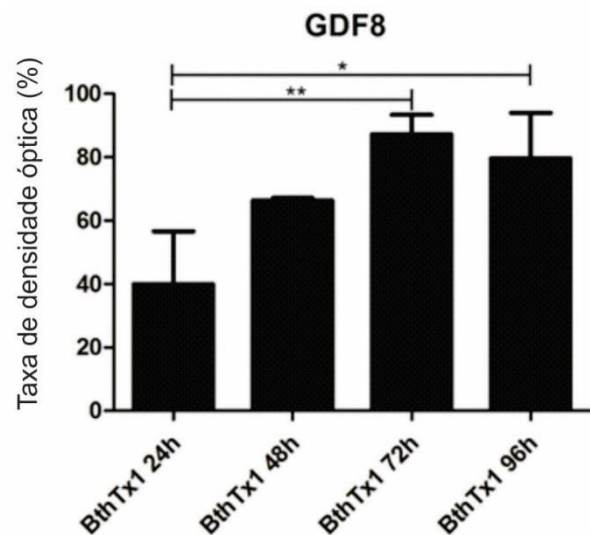


Gráfico 10: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de GDF-8 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 1 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste t

de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste t de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para GDF-8 foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx1* na comparação entre os períodos **24h vs 72h** ($p \leq 0.01$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.05$).

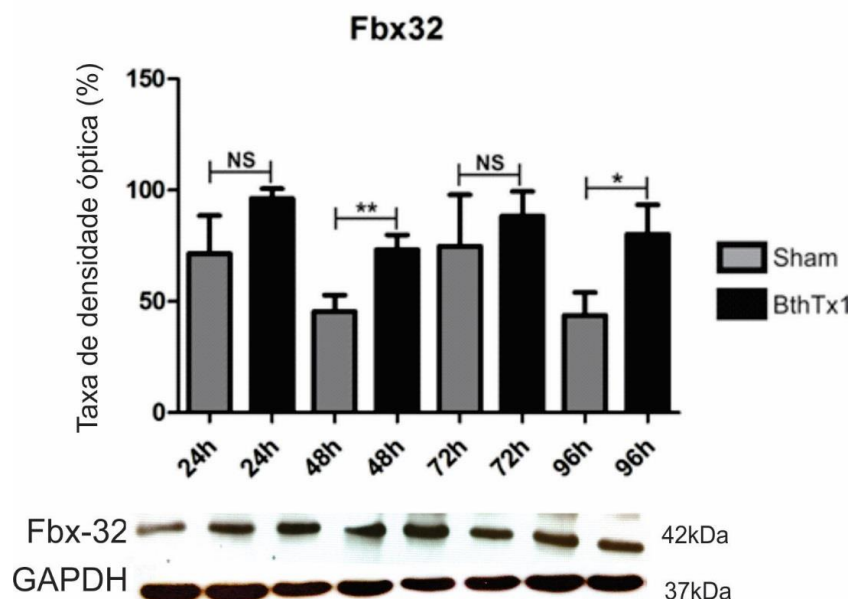
Gráfico 11: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *GDF-8* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- Fbx-32

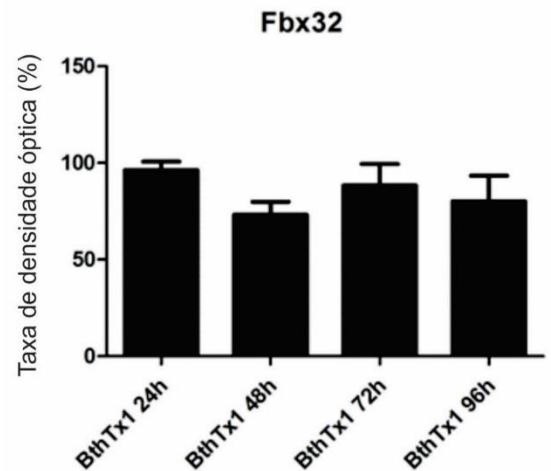
A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de Fbx-32 mostrou diferenças significativas entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx1 48h* ($p < 0.01$) e entre os grupos *Sham 96h* e *BthTx1 96h* ($p < 0.05$). Na comparação dos demais grupos não foram observadas diferenças significativas.

Gráfico 12: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de Fbx-32 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 1 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste t de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste t de Student quando comparados aos controles.



Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para Fbx-32, não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx1*.

Gráfico 13: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Fbx-32* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- MuRF-1

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de MuRF-1 mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de MuRF-1 apenas na comparação entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx1 48h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

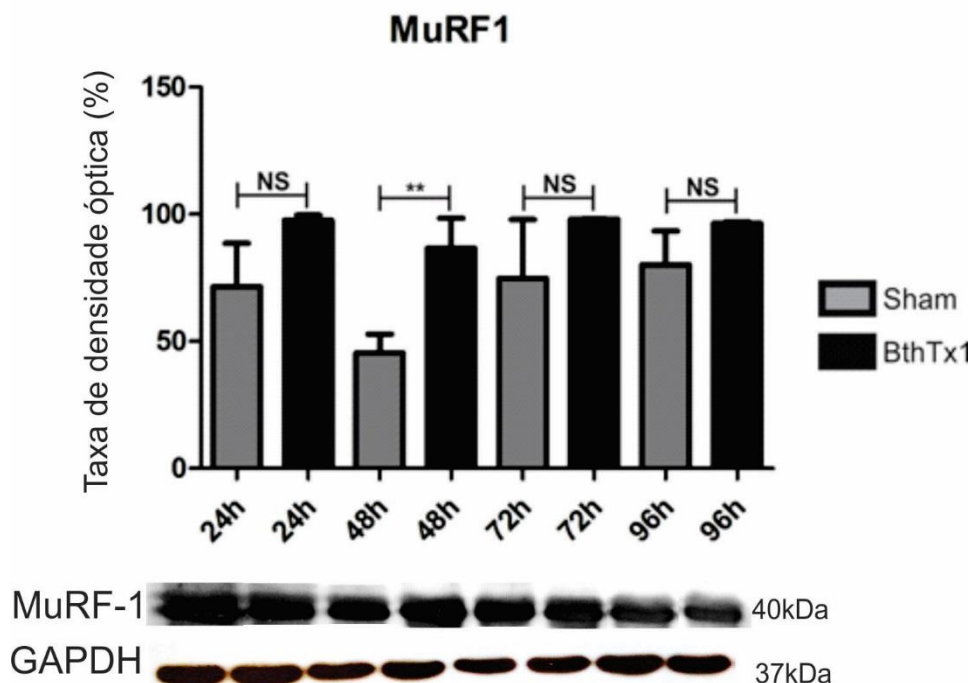
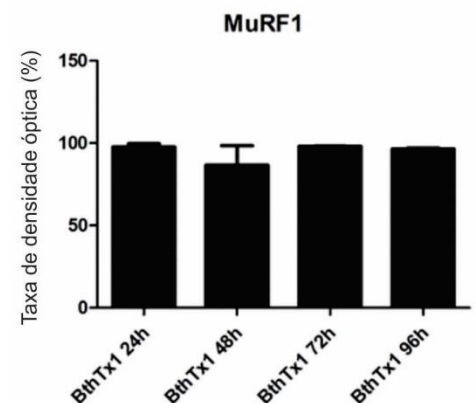


Gráfico 14: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de MuRF-1 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 1 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para MuRF-1, não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx1*.

Gráfico 15: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MuRF-1* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



6.3 – Análise de expressão protéica com Bothropsina – 2 (BthTx-2)

- MyoD

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de MyoD mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de MyoD apenas na comparação entre os grupos *Sham 24h* e *BthTx2 24h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

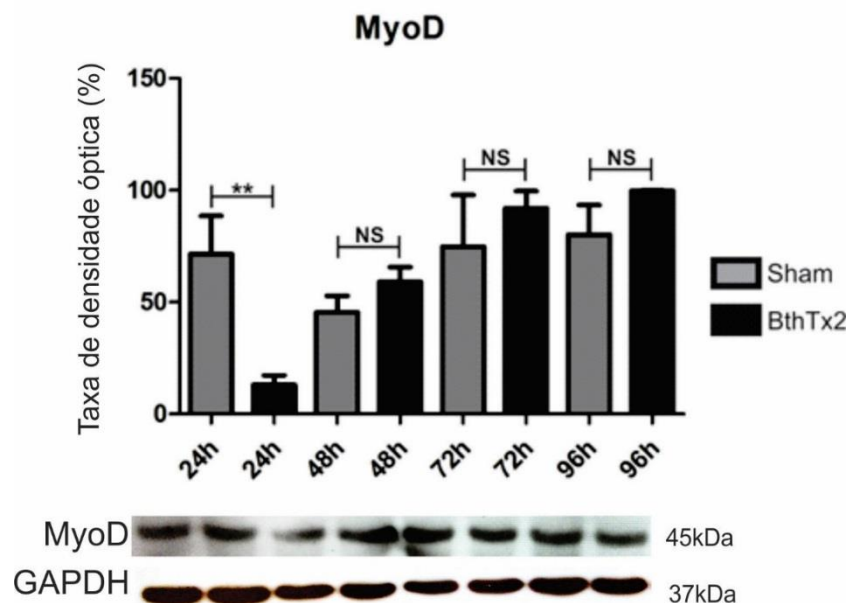
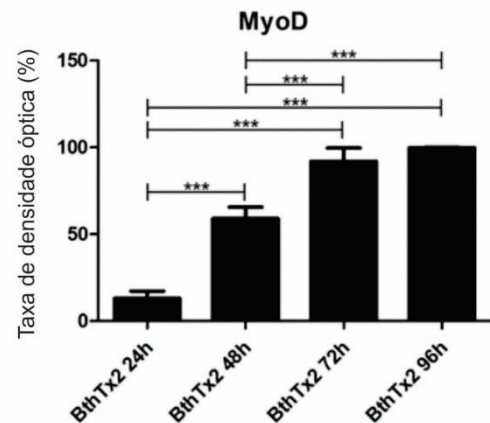


Gráfico 16: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 2 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para MyoD foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo

BthTx2 na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.001$), **48h vs 72h** ($p \leq 0.001$), **48h vs 96h** ($p \leq 0.001$).

Gráfico 17: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MyoD* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-II isolada (*BthTx2*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- **Myog**

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de *Myog* mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de *Myog* apenas na comparação entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx2 48h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

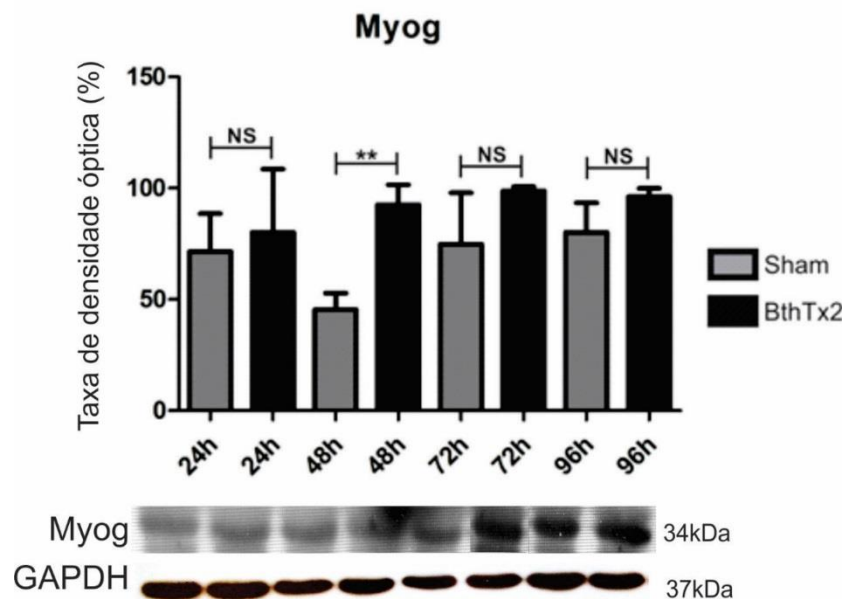
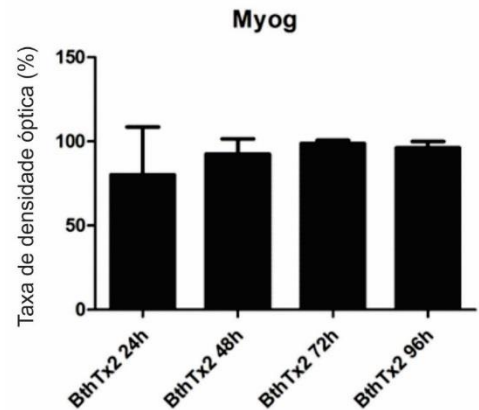


Gráfico 18: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Myog* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 2 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para *Myog*, não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx2*.

Gráfico 19: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Myog* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-I isolada (*BthTx1*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- GDF-8

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de GDF-8 mostrou diferenças significativas entre os grupos *Sham 24h* e *BthTx2 24h* ($p < 0.01$) e entre os grupos *Sham 48h* e *BthTx2 48h* ($p < 0.01$). Na comparação dos demais grupos não foram observadas diferenças significativas.

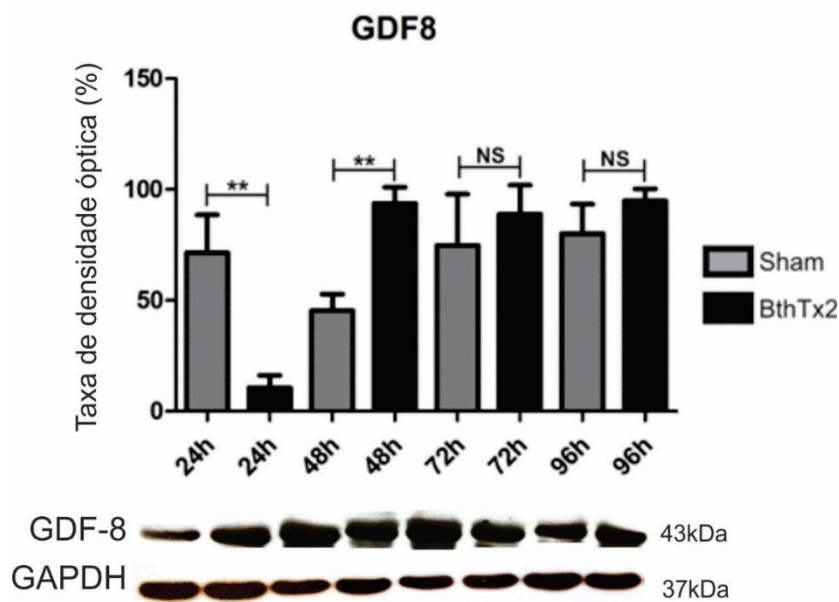
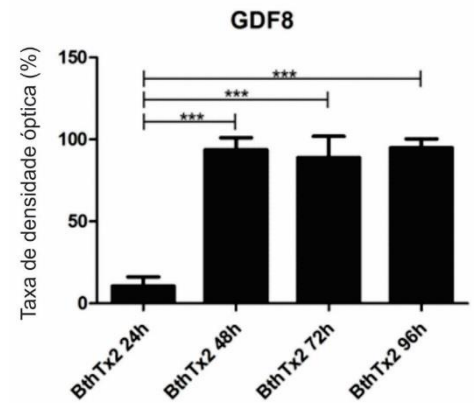


Gráfico 20: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de GDF-8 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 2 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para GDF-8 foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx2* na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.001$).

Gráfico 21: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *GDF=8* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-II isolada (*BthTx2*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- Fbx-32

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de Fbx-32 mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de Fbx-32 apenas na comparação entre os grupos *Sham 24h* e *BthTx2 24h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

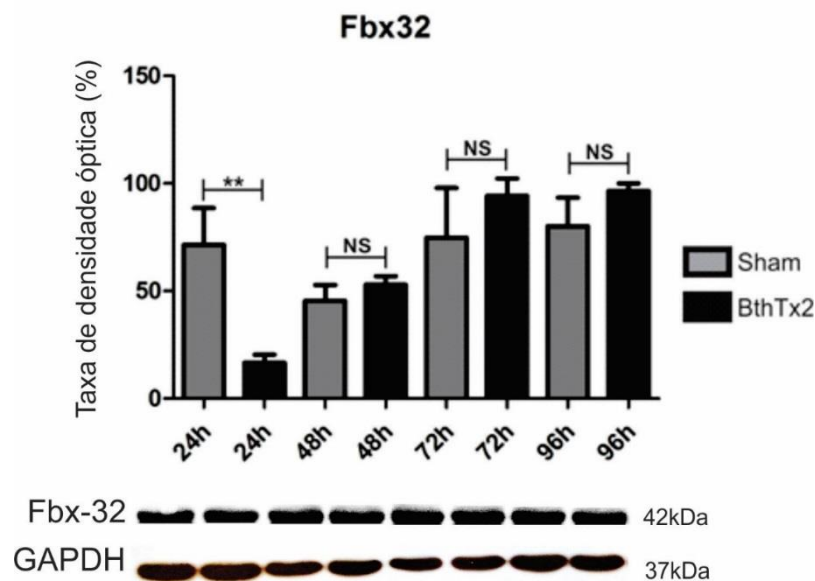
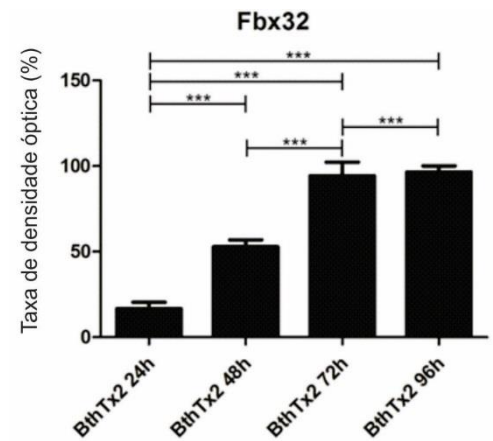


Gráfico 22: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de Fbx-32 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 2 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para Fbx-32 foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx2* na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 72h** ($p \leq 0.001$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.001$), **48h vs 72h** ($p \leq 0.001$), **72h vs 96h** ($p \leq 0.001$).

Gráfico 23: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *Fbx-32* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-II isolada (*BthTx2*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



- MuRF-1

A análise densitométrica em triplicata de imunoblots de MuRF-1 mostrou diferença significativa ($p < 0.01$) na expressão relativa de MuRF-1 apenas na comparação entre os grupos *Sham 24h* e *BthTx2 24h*. Entre os demais grupos não foram observadas diferenças significativas no tratamento.

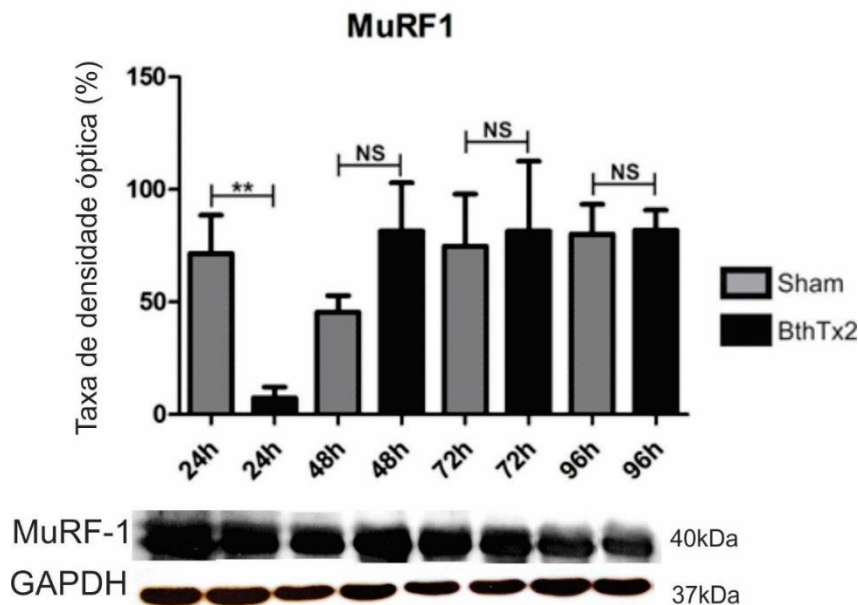
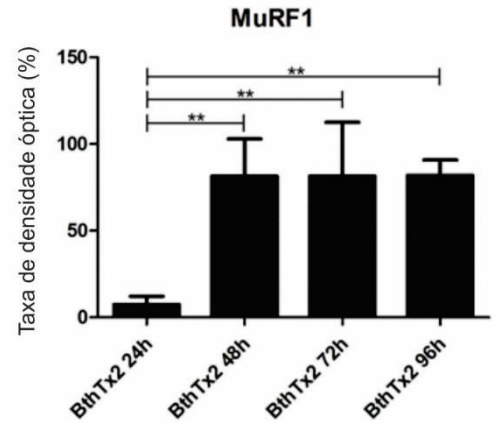


Gráfico 24: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de MuRF-1 nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropsina – 2 isolada (2,5 mg/kg) ou solução salina (0,9%). Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Por meio da análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, para MuRF-1 foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes períodos do grupo *BthTx2* na comparação entre os períodos **24h vs 48h** ($p \leq 0.01$), **24h vs 48h** ($p \leq 0.01$), **24h vs 96h** ($p \leq 0.01$).

Gráfico 25: Expressão gráfica da densidade de pixels dos blots de *MuRF-1* nos diferentes tempos analisados após injeção i.m. de Bothropstoxina-II isolada (*BthTx2*) (2,5 mg/kg). Análise de variância ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância quando comparados entre si.



6.4 – Análise da função motora dinâmica

6.4.1 – Apoio

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores médios do *Apoio* (s), seguidos pelo desvio padrão da média dos diferentes grupos experimentais (*Sham* e *Bjussu*) no decorrer dos diferentes períodos de tempo (pré-lesão, 3, 24, 48, 72h e 96h pós-lesão (n=5 e 3 corridas coletadas por animal)).

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão do *Apoio* (s) do membro esquerdo

	Membro esquerdo (contralateral)					
Grupo	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	0.11 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0	0.08 $\pm$ 0.04
<i>Bjussu</i>	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão do *Apoio* (s) do membro direito

	Membro direito (tratado)					
Grupo	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	0.10 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0	0.08 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0	0.08 $\pm$ 0.04
<i>Bjussu</i>	0.07 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0	0.06 $\pm$ 0	0.07 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0

A análise estatística baseada no comportamento individual no decorrer dos diferentes tempos revelou diferenças significativas do parâmetro *Apoio* (s) do membro direito, na comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu* nos períodos de Pré-injúria ($p \leq 0.01$), 3h e 48 ($p \leq 0.001$).

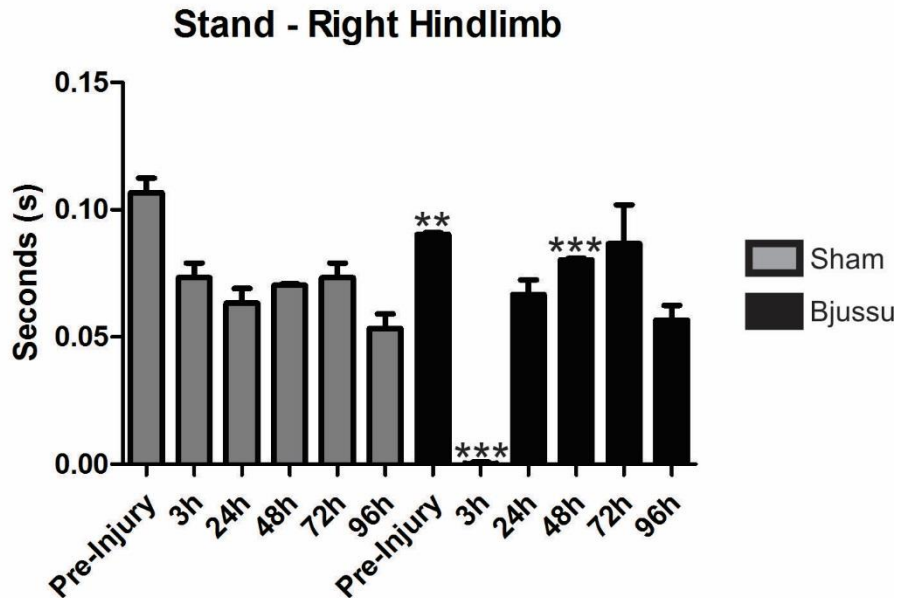


Gráfico 26 – Comportamento do *Apoio* (s) do membro direito para os grupos *Bjussu* e *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Na comparação baseada no comportamento individual no decorrer dos diferentes tempos revelou diferenças significativas do parâmetro *Apoio* (s) do membro esquerdo (contralateral), na comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu* nos períodos de 72h e 96h ($p \leq 0.05$).

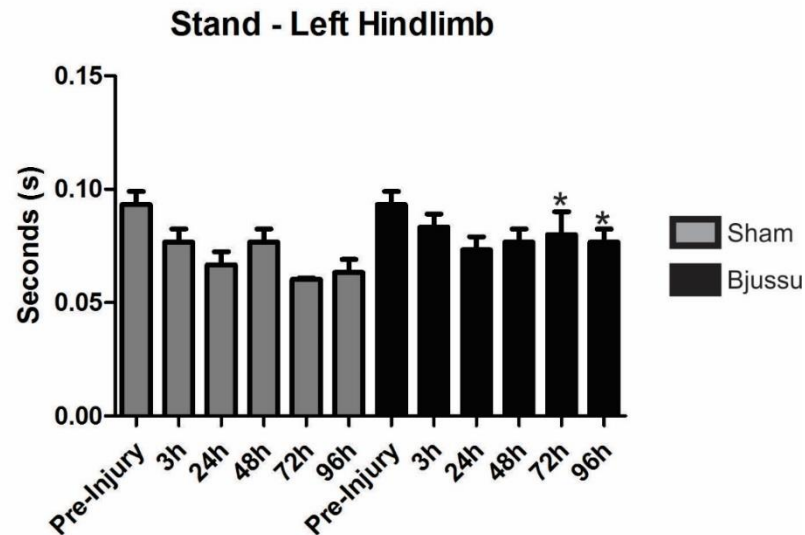


Gráfico 27 – Comportamento do *Apoio* (s) do membro esquerdo (contralateral) para os grupos *Bjuusu* e *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Também foi realizada a análise da comparação do parâmetro *Apoio* (s) entre o membro direito e o esquerdo (contralateral) para cada período de tratamento (24, 48, 72 e 96h) dos dois grupos *Bjuusu* e *Sham*.

Os animais do grupo *Sham* apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante para ambos os membros, não apresentando assim diferenças significativas.

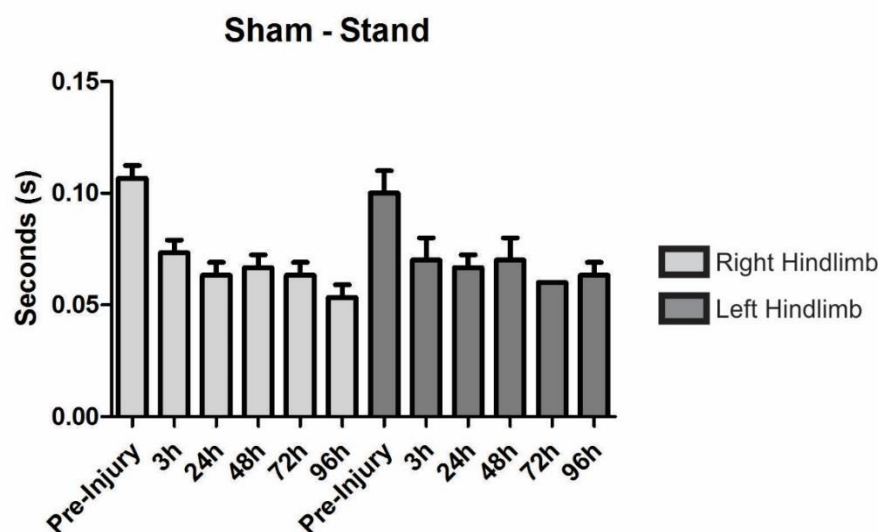


Gráfico 28 – Análise da comparação do comportamento do *Apoio* (s) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os

dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Animais do grupo *Bjussu* apresentaram alteração no padrão de comportamento significativas na comparação entre os membros direito e esquerdo nos períodos de 3h ($p \leq 0.001$) e 96h ($p \leq 0.05$).

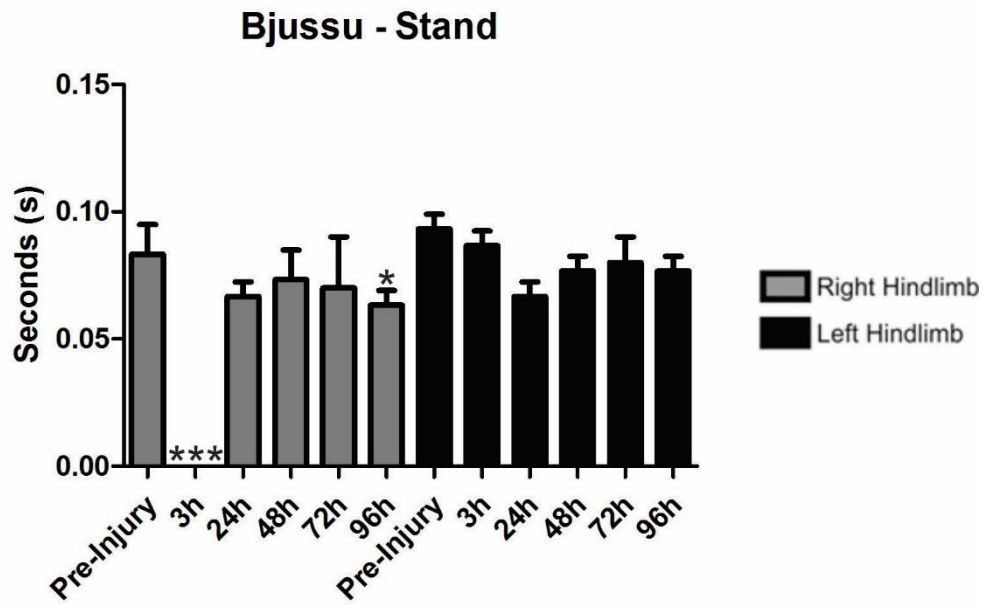


Gráfico 29 – Análise da comparação do comportamento do *Apoio* (s) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Bjussu* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

6.4.2 – Intensidade Máxima

As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores médios da *Intensidade Máxima* (u.a.), seguidos pelo desvio padrão da média dos diferentes grupos experimentais (*Sham* e *Bjussu*) no decorrer dos diferentes períodos de tempo (pré-lesão, 3, 24, 48, 72h e 96h pós-lesão (n=5 e 3 corridas coletadas por animal)).

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro esquerdo

Grupo	Membro esquerdo (contralateral)					
	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas

Sham	179.7 ± 9.0	170.2 ± 8.4	150.8 ± 4.6	129.8 ± 3.8	129.8 ± 3.8	162.4 ± 10
Bjussu	141.3 ± 4.4	147.7 ± 4.3	155.0 ± 6.1	154.5 ± 2.5	134.8 ± 4.7	166.3 ± 2.1

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro direito

Grupos	Membro direito (tratado)					
	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Sham	196.0 ± 5.9	162.9 ± 7.0	114.1 ± 5.3	140.0 ± 5.4	126.4 ± 4.5	144.4 ± 5.8
Bjussu	129.6 ± 4.8	0 ± 0	116.6 ± 5.8	145.4 ± 1.0	133.9 ± 2.3	161.8 ± 6.0

A análise estatística baseada no comportamento individual no decorrer dos diferentes tempos revelou diferenças significativas do parâmetro *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro direito, na comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu* nos períodos de Pré-injúria e 3h ($p \leq 0.001$).

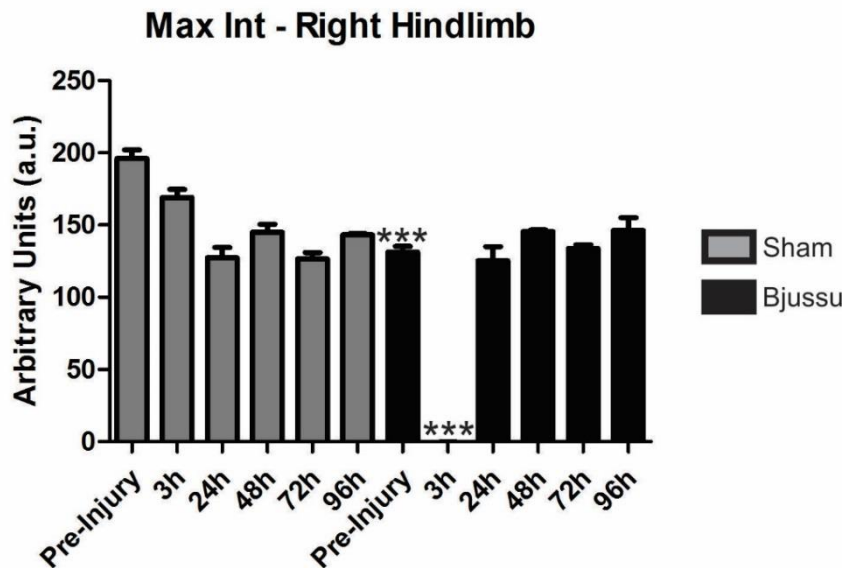


Gráfico 30 – Comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) do membro direito para os grupos *Bjussu* e *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média ± EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Também foi realizada a análise da comparação do parâmetro *Intensidade Máxima* (u.a.) entre o membro direito e o esquerdo (contralateral) para cada período de tratamento (24, 48, 72 e 96h) dos dois grupos *Bjussu* e *Sham*.

Os animais do grupo *Sham* apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante para ambos os membros, não apresentando assim diferenças significativas.

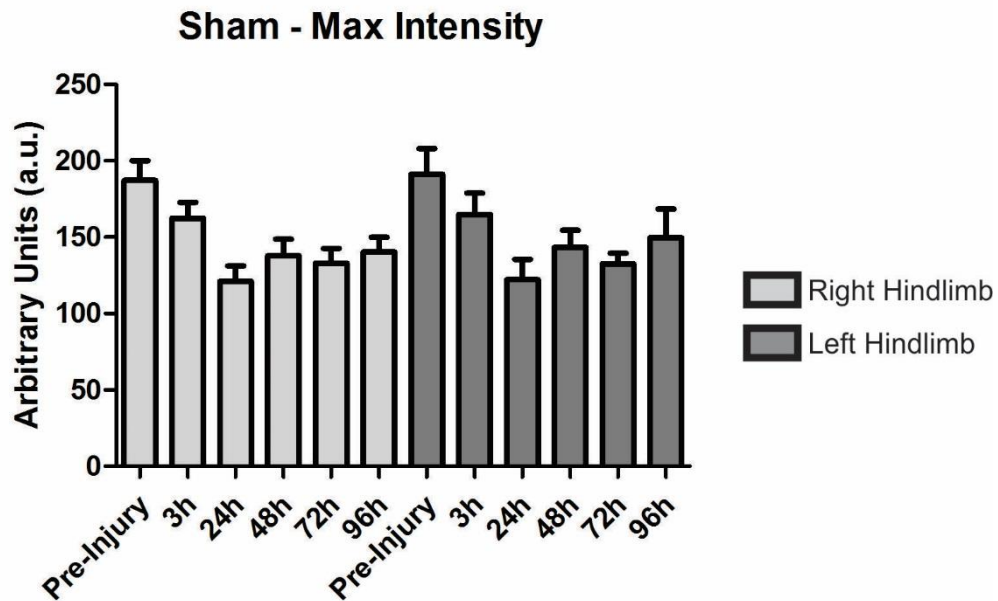


Gráfico 31 – Análise da comparação do comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Animais do grupo *Bjussu* apresentaram alteração no padrão de comportamento significativas na comparação entre os membros direito e esquerdo nos períodos de pré-injúria ($p \leq 0.05$), 3h ($p \leq 0.001$), 24h ($p \leq 0.001$) e 48h ($p \leq 0.01$).

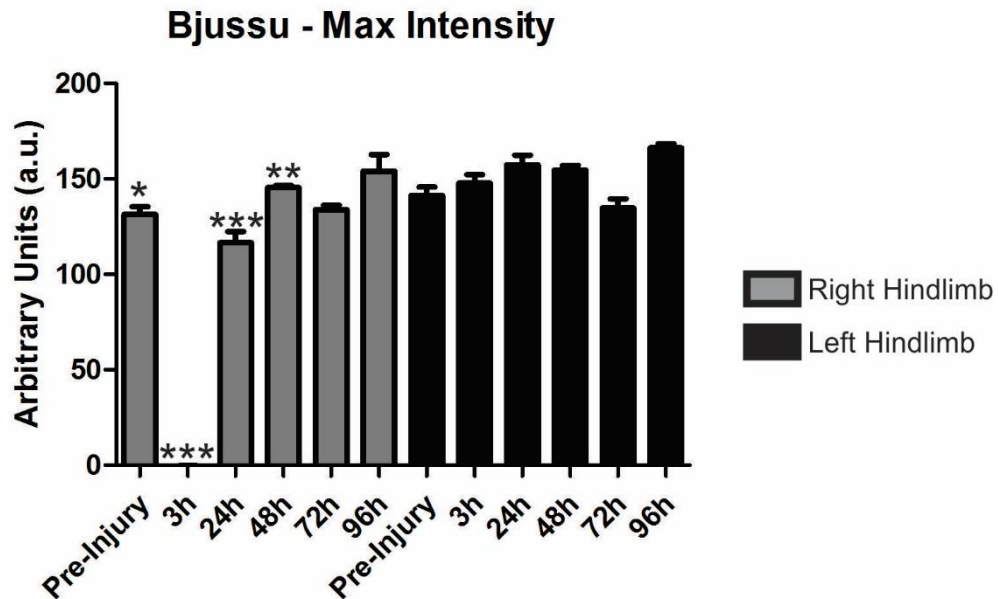


Gráfico 32 – Análise da comparação do comportamento da *Intensidade Máxima* (u.a.) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Bjussu* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

6.4.3 – Velocidade de Balanço

As Tabelas 6 e 7 apresentam os valores médios da *Velocidade de Balanço* (cm/s), seguidos pelo desvio padrão da média dos diferentes grupos experimentais (*Sham* e *Bjussu*) no decorrer dos diferentes períodos de tempo (pré-lesão, 3, 24, 48, 72h e 96h pós-lesão (n=5 e 3 corridas coletadas por animal).

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão da *Velocidade de Balanço* (cm/s) do membro esquerdo

Grupos	Membro esquerdo (contralateral)					
	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	70.3 $\pm$ 5.7	90.8 $\pm$ 5.8	92.4 $\pm$ 3.5	108.9 $\pm$ 4.0	94.3 $\pm$ 5.2	122.0 $\pm$ 7.3
<i>Bjussu</i>	102.9 $\pm$ 5.2	96.7 $\pm$ 8.0	107.6 $\pm$ 18.0	103.3 $\pm$ 6.9	121.3 $\pm$ 1.7	114.9 $\pm$ 7.8

Tabela 7 – Valores médios e desvio padrão da *Velocidade de Balanço* (cm/s) do membro direito

Grupos	Membro direito (tratado)					
	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	87.6 ± 4.6	105.9 ± 6.0	83.5 ± 7.9	96.4 ± 3.4	94.6 ± 7.1	103.6 ± 11.8
<i>Bjussu</i>	82.5 ± 11.6	0.0 ± 0.0	89.9 ± 5.6	98.8 ± 5.3	132.2 ± 11.4	108.0 ± 17.8

A análise estatística baseada no comportamento individual no decorrer dos diferentes tempos revelou diferenças significativas do parâmetro *Velocidade de Balanço* (cm/s) do membro direito, na comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu* nos períodos de Pré-injúria ($p \leq 0.001$), 3h ($p \leq 0.001$) e 24h ($p \leq 0.01$).

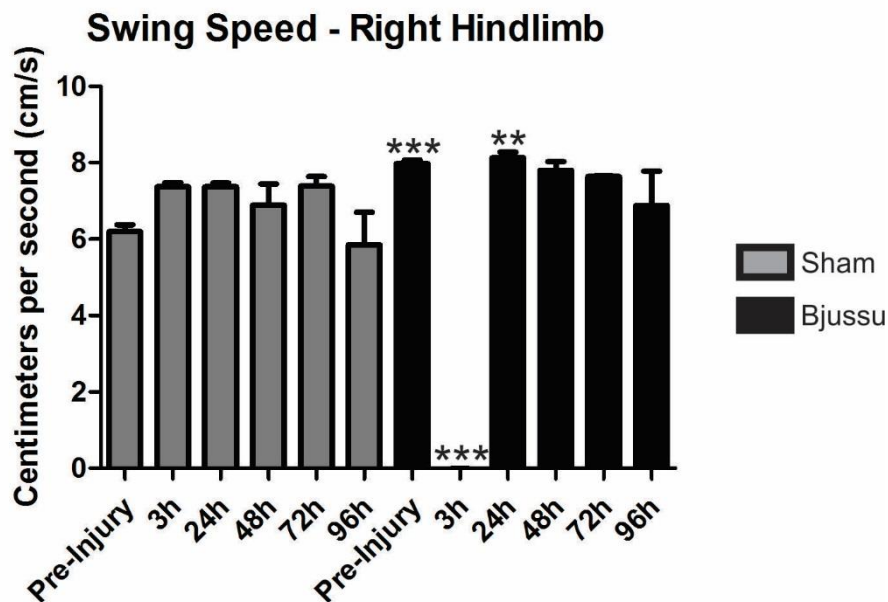


Gráfico 33 – Comportamento da *Velocidade de Balanço* (cm/s) do membro direito para os grupos *Bjussu* e *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média ± EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Também foi realizada a análise da comparação do parâmetro *Velocidade de Balanço* (cm/s) entre o membro direito e o esquerdo (contralateral) para cada período de tratamento (24, 48, 72 e 96h) dos dois grupos *Bjussu* e *Sham*.

Os animais do grupo *Sham* apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante para ambos os membros, porém foram observadas diferenças significativas para os períodos de pré-injúria, 3h e 48h ($p \leq 0.05$).

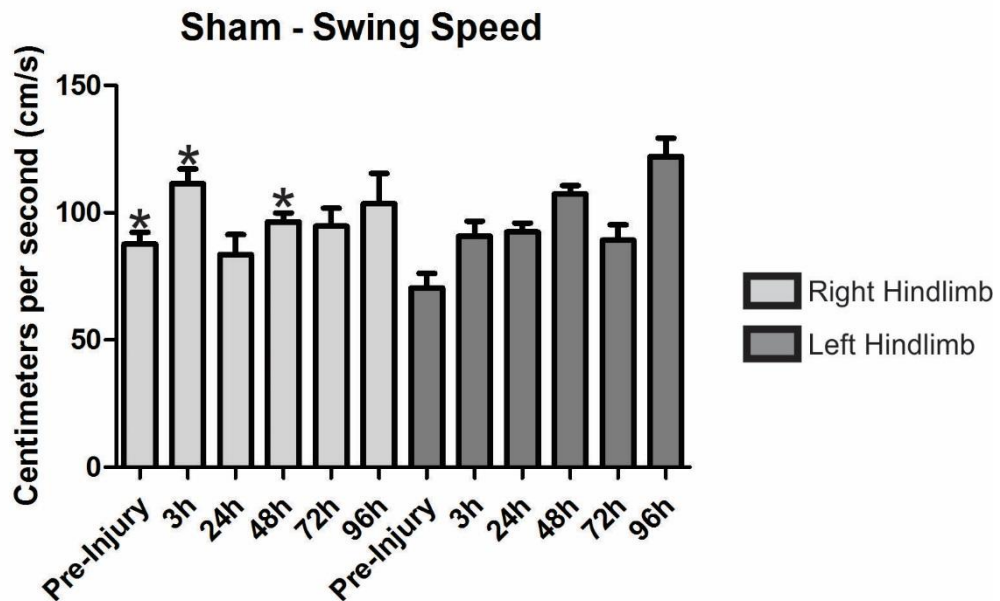


Gráfico 34 – Análise da comparação do comportamento da *Velocidade de Balanço* (cm/s) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Animais do grupo *Bjussu* apresentaram alteração no padrão de comportamento significativas na comparação entre os membros direito e esquerdo somente no período de 3h ($p \leq 0.001$).

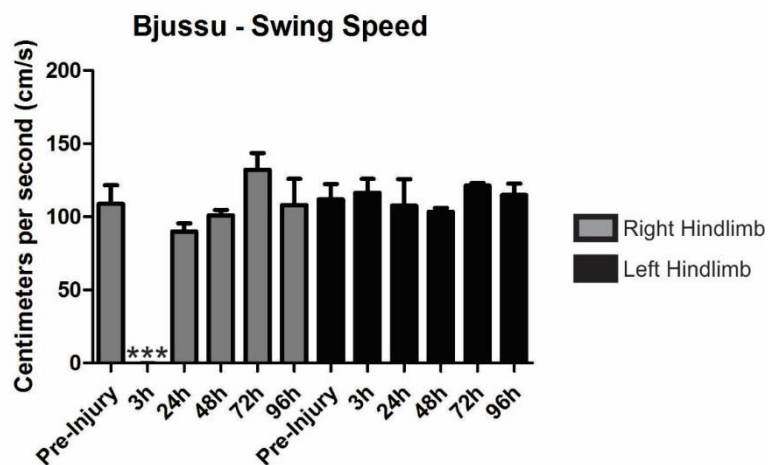


Gráfico 35 – Análise da comparação do comportamento da *Velocidade de Balanço* (cm/s) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Bjussu* nos diferentes períodos analisados.

Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

6.4.4 – Comprimento da passada

As Tabelas 8 e 9 apresentam os valores médios do *Comprimento da passada* (cm), seguidos pelo desvio padrão da média dos diferentes grupos experimentais (*Sham* e *Bjussu*) no decorrer dos diferentes períodos de tempo (pré-lesão, 3, 24, 48, 72h e 96h pós-lesão).

Tabela 8 – Valores médios e desvio padrão do *Comprimento da Passada* (cm) do membro esquerdo

Grupo	Membro esquerdo (contralateral)					
s	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	5.7 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.8
<i>Bjussu</i>	8.0 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 1.2

Tabela 9 – Valores médios e desvio padrão do *Comprimento da Passada* (cm) do membro direito

Grupo	Membro direito (tratado)					
s	Pré-injúria	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Sham</i>	6.1 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.8
<i>Bjussu</i>	7.9 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	8.1 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 1.2

A análise estatística baseada no comportamento individual no decorrer dos diferentes tempos revelou diferenças significativas do parâmetro *Comprimento de Passada* (cm) do membro direito, na comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu* nos períodos de Pré-injúria ($p \leq 0.001$), 3h ($p \leq 0.001$) e 24h ($p \leq 0.01$).

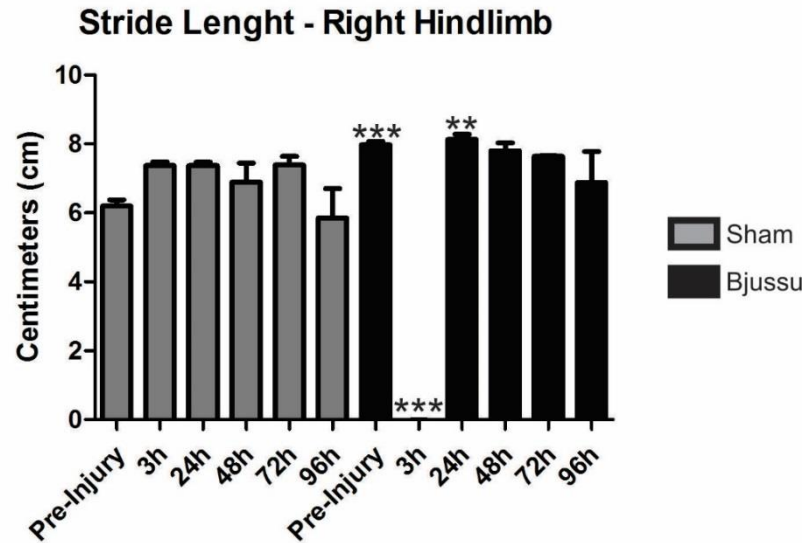


Gráfico 36 – Comportamento do *Comprimento de Passada* (cm) do membro direito para os grupos *Bjussu* e *Sham* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Também foi realizada a análise da comparação do parâmetro *Comprimento de Passada* (cm) entre o membro direito e o esquerdo (contralateral) para cada período de tratamento (24, 48, 72 e 96h) dos dois grupos *Bjussu* e *Sham*.

Os animais do grupo *Sham* apresentaram um padrão de comportamento muito semelhante para ambos os membros, porém foram observadas diferenças significativas para os períodos de pré-injúria e 3h ($p \leq 0.05$).

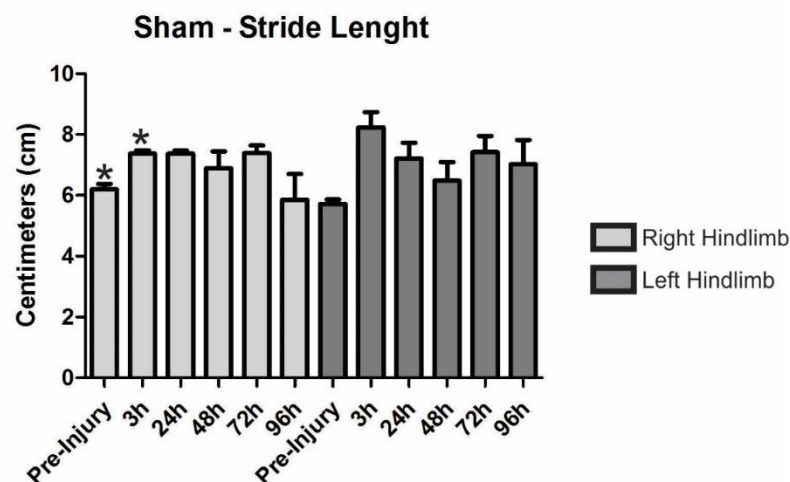


Gráfico 37 – Análise da comparação do comportamento da *Comprimento de Passada* (cm) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Sham* nos diferentes períodos analisados.

Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

Animais do grupo *Bjussu* apresentaram alteração no padrão de comportamento significativas na comparação entre os membros direito e esquerdo somente no período de 3h ($p \leq 0.001$).

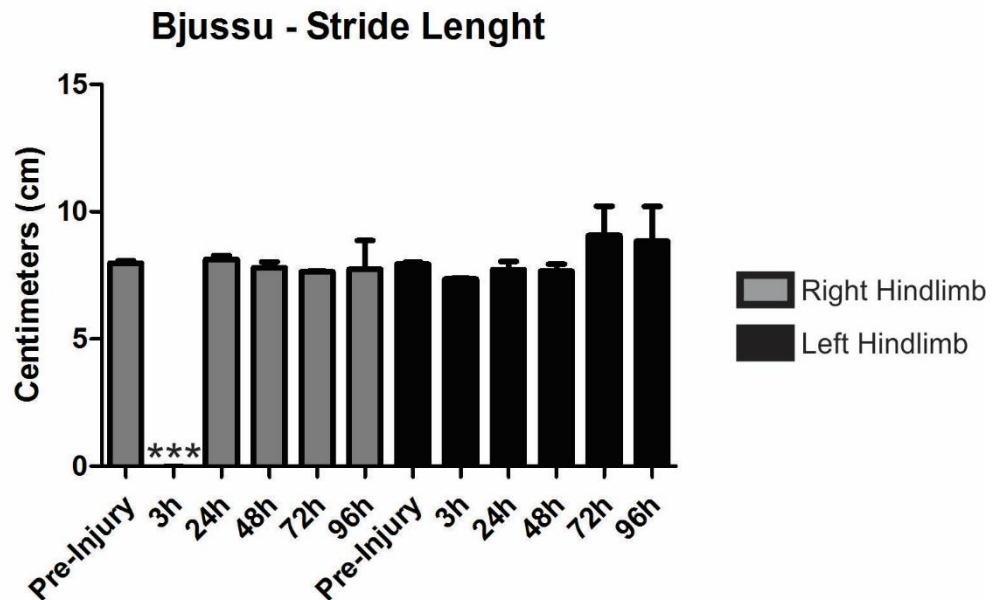


Gráfico 38 – Análise da comparação do comportamento da *Comprimento da Passada* (cm) entre os membros direito e esquerdo (contralateral) para o grupo *Bjussu* nos diferentes períodos analisados. Teste *t* de Student. Os dados estão representados como média $\pm$ EP da média. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ representam significância no teste *t* de Student quando comparados aos controles.

7 – DISCUSSÃO

7.1 – Expressão protéica em modelo de injúria reproduzido com veneno bruto de *Bothrops jararacussu*

As serpentes peçonhentas apresentam os mecanismos de caça e defesa integrados mais avançados da natureza, já que seus venenos são complexas misturas de centenas de proteínas e peptídeos cuja função é de imobilizar, matar ou auxiliar na digestão das presas (MENEZES *et al*, 2006). Esse perfil farmacológico diversificado é resultado do processo de evolução ocorrido a cerca de 60 a 80 milhões de anos atrás, quando se tem registro do surgimento das glândulas de veneno (FRY, 2005).

As proteínas que compõem o veneno das serpentes são em sua maior parte fosfolipases do tipo A2 (PLA₂) (ANDRIÃO-ESCARSO *et al*, 2000), sendo que necrose muscular, perda permanente de tecido, amputação e incapacitação de membros são consequências dos efeitos locais de envenenamento de muitas espécies (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as que mais causam acidentes na América Latina (ZAMUNER *et al*, 2001; DOURADO *et al*, 2011).

Envenenamento por serpentes desse gênero apresentam principalmente sintomas locais relacionados à necrose muscular, enquanto que também pode apresentar sintomas sistêmicos como coagulopatia e hemorragia (WHITE, 2005). Considerando que os efeitos descritos são decorrentes da ação de uma série de proteínas, enzimas e peptídeos presentes no veneno, como fosfolipases A2, metaloproteinases, serinoproteases, L-amino-ácido oxidases (LAAO), fator de crescimento de nervos (NGF), lectinas do tipo C e proteínas ricas em cisteína (CORREA-NETO *et al*, 2010).

Ao mesmo tempo em que ocorre a ação das enzimas hemorrágicas e proteolíticas, ocorre também destruição dos vasos sanguíneos, tendo a falência da microcirculação e dano por anóxia como consequência indireta do envenenamento. Além disso ocorre a destruição de nervos motores, o que contribui ainda mais para a perda de funcionalidade muscular (MEBS & OWNBY, 1990; QUEIROZ *et al*, 2002; VERONESE *et al*, 2003).

Sendo que o único tratamento disponível para esses casos de envenenamentos é a soroterapia: soro antibotrópico (SAB) ou soro antibotrópico-laquéutico (SABL). Contudo, além da utilização da soroterapia representar risco de reações alérgicas à vítima, ela não é eficiente na redução do avanço dos danos teciduais locais.

As toxinas animais representam ferramentas importantes na investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos processos de degradação e regeneração tecidual decorrentes de acidentes ofídicos.

Nesse contexto, esse estudo visou elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na evolução do quadro de remodelamento do tecido muscular após acidente com serpente do gênero *Bothrops*, para enfim subsidiar no futuro o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficientes para tratamento das vítimas.

Como esperado, qualquer estímulo químico, físico ou que ocasione a desestabilização da membrana basal, é suficiente para ativar a resposta regenerativa do tecido muscular esquelético, e conseqüentemente as células satélite (HAWKE & GARRY, 2001; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; HOLTERMAN & RUDNICKI, 2005).

No modelo de lesão desenvolvido em nosso estudo, após realizada análise qualitativa de expressão protéica (IHQ), foi possível observar que após a injeção de veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, como esperado mostrou o processo de ativação dos fatores de transcrição miogênicos (MRFs) *MyoD* e *Myog* em todos os períodos de análise (24, 48, 72 e 96 horas). Considerando que as fibras em processo necrótico e membranas fantasma (membranas basais) foram as estruturas que mais apresentaram as marcações positivas.

Interessantemente *MyoD*, durante a miogênese embrionária, está diretamente relacionado à especificação e determinação da linhagem miogênica, e durante o período pós natal está relacionado tanto à função de proliferação de mioblastos para reposição de miofibras (MEGENEY *et al*, 1996), quanto ao processo de diferenciação terminal, e junto à *Myog*, ambos atuam como promotores da diferenciação terminal de mioblastos (HAWKE & GARRY, 2001; CHARGÉ & RUDNICKI, 2004; GREFFE *et al*, 2007).

Na análise de *Western Blotting* para *MyoD*, em comparação entre os grupos *Sham* e *Bjussu*, foi possível observar aumento de expressão significativo apenas para o grupo *Bjussu* no período de 96 horas. Já para *Myog* foi possível observar aumento significativo de expressão para o grupo *Bjussu* somente no período de 72 horas.

Esses resultados sugerem que, no nosso modelo de injúria muscular induzida por veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, os fatores de transcrição *MyoD* e *Myog* apresentam função importante no processo de diferenciação celular terminal, ou seja, na diferenciação de mioblastos para miócitos e na formação e fusão de miotubos.

A miostatina ou GDF-8 é uma proteína circulante da superfamília TGF- β , cuja função é de atuar como regulador negativo da hipertrofia e hiperplasia muscular (HAWKE & GARRY, 2001; KOLLIAS & MCDERMOTT, 2008; MCFARLANE, 2007; PATEL & AMTHOR, 2005; TOBIN & CELESTE, 2005; WEHLING *et al.*, 2000; WHITTEMORE *et al.*, 2003).

Segundo experimentos realizados por Whittemore *et al* (2003), a inibição de GDF-8 através da administração farmacológica de anticorpos anti-GDF-8 resulta em aumento de massa muscular do gastrocnêmio em aproximadamente 23% e para o quadríceps em até 30%.

Zhang *et al* (2011) também realizou em seus experimentos, a inibição de GDF-8 *in vivo* em modelo de doença renal crônica utilizando administração farmacológica de anticorpos anti-GDF-8. E como resultado observou aumento significativo de massa muscular 7 dias após tratamento e que persistiram até 28 dias depois.

Em nosso modelo de lesão, a expressão da miostatina nos períodos de 24 e 48 horas foi observada nas miofibras necróticas e membranas fantasma, nos períodos de 72 e 96 horas é possível observar sua expressão nos mionúcleos em proliferação, miotubos em formação e fibras nervosas. Na análise de *Western Blotting*, a injeção com veneno bruto de *Bothrops jararacussu* promoveu aumento significativo de expressão de GDF-8 somente no período de 96 horas.

Esse resultado pode reforçar, no nosso modelo, o papel como modulador negativo de GDF-8, indicando que essa proteína pode ter função crucial no interrompimento do processo de proliferação celular. E também participação no controle de diferenciação terminal, junto à MyoD e Myog.

A via ubiquitina-proteassomo é a maior via não lisossomal responsável pela quebra de proteínas nas células eucarióticas (TAILLANDIER *et al*, 2004). A superexpressão dessa via pode ser observada em várias condições patológicas humanas, como por exemplo: esclerose amiotrófica lateral (LÉGER *et al*, 2006), falência renal, doenças neuromusculares, imobilização, diabetes, sépsis, caquexia induzida por câncer, síndrome de cushing e hipertireoidismo (MITCH & GOLDBERG, 1996; LECKER *et al*, 1999).

Independentemente da causa, a superexpressão da via ubiquitina-proteassomo leva ao mesmo resultado: a perda extensiva de massa muscular, podendo ter como consequência a perda de funcionalidade do tecido e assim aumento de letalidade (LECKER *et al*, 1999; BALTGAVIN *et al*, 2008; SCHWARTZ & CIECHANVOER, 2009; SENF *et al*, 2008; KHARRAZ *et al*, 2013).

Nos nossos experimentos, demonstraram que a injúria produzida pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* não afetou a expressão de Fbx32, uma das proteínas marcadoras da via ubiquitina-proteassomo. Por outro lado, em comparação dos grupos *Sham* e *Bjussu*, observou-se que o grupo *Sham* apresentou aumento de expressão significativo para MuRF-1, outro marcador da via ubiquitina-proteassomo, no período de 96 horas.

Esse resultado indica, dentro da limitação do nosso modelo de injúria, que a via ubiquitina-proteassomo não participa de forma significativa na degradação de proteínas e perda de massa muscular, assim essa via possivelmente não participa de forma direta nas sequelas causadas por acidentes botrópicos.

Além disso, segundo experimentos realizados por Tintignac *et al* (2005) demonstram que Fbx-32 tem MyoD como proteína alvo de ubiquitinação. Assim o fato de ter ocorrido elevação de expressão proteica de MyoD no grupo *Bjussu* e no período de 96 horas, enquanto

que a expressão de Fbx-32 se mantém inalterada, pode indicar que a via do proteassomo não se apresenta ativa.

Porém, para confirmar essa hipótese seria necessário desenvolver, com a mesma toxina, períodos de pós envenenamento mais longos, e realizar experimentos que testem a atividade proteolítica das proteínas em questão (Fbx-32 e MuRF-1), além de outros componentes da via, como por exemplo o proteassomo 26S.

Em nosso estudo o músculo gastrocnêmio foi coletado e homogeneizado em sua totalidade, sendo descartadas apenas a região proximal e distal. Messa (2008) descreve que a distribuição dos MRFs ao longo da fibra muscular é bastante contraditória (CARSON & BOOTH, 1998; ZÁDOR *et al*, 1999; HILL & GOLDSPIK, 2003). Podendo a expressão dos genes Fbx-32 e MuRF-1, possivelmente também seguir essa lógica, explicando o aumento de expressão de MuRF-1 no grupo *Sham* em comparação ao grupo *Bjussu* no período de 96 horas.

7.2 – Expressão protéica em modelo de injúria reproduzido com botropsinas I e II isoladas de veneno bruto de *Bothrops jararacussu*

As fosfolipases A₂ são enzimas de expressão ubíqua que catalisam ligações éster *sn*-2 dos fosfolipídios liberando ácidos graxos, lisofosfolipídios e ácido araquidônico, estando esse último envolvido com o desencadeamento do processo inflamatório, podendo seu papel também estar relacionado a uma série de condições patológicas como aterosclerose, esquizofrenia e Alzheimer. (MURAKAMI *et al*, 2008).

Venenos de serpentes representam uma fonte abundante de PLA₂s, que exibem uma vasta gama de atividades farmacológicas que incluem: efeitos miotóxicos, hemolíticos, hipotensivos, formação de edema e neurotoxicidade pré e pós sináptica (MURAKAMI *et al*, 2008). A partir do veneno de *Bothrops jararacussu* foram isolados dois tipos básicos de miotoxinas BthTX-I e BthTX-II, sendo a primeira uma Lys49 e a segunda uma Asp49, respectivamente (HOMSI-BRANDENBURGO *et al*, 1988; VERONESE *et al*, 2005; MURAKAMI *et al*, 2008).

Segundo estudos realizados por Cintra *et al* (1993) a BthTx-I é uma proteína de cadeia simples composta por 121 resíduos de aminoácidos. Também pode ser considerada homóloga à isolada de *B. atrox*, *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *T. flaoorividis* I e II, *Bothrops asper*, assim como as PLA₂s pancreáticas.

Em estudo realizado por Murakami *et al* (2008), a injeção de BthTx-I (2.5µg/g) foi capaz de alterar significativamente as concentrações de CK plasmática, indicando assim intensa atividade miotóxica.

Estudos realizados por Gutierrez *et al* (1991) demonstram que a BthTx-II afeta primariamente as fibras musculares e não afeta outras estruturas como os vasos sanguíneos, nervos e membrana basal, promovendo um processo regenerativo satisfatório.

Em análise de *Western Blotting* após a injeção de botropsina I, foi possível observar que para a expressão da proteína MyoD, o tratamento não causou alterações significativas em nenhum dos períodos analisados.

Para a Myog e MuRF-1, em comparação do grupo *Sham* com *BthTx1* ocorreu diferença significativa para o grupo *BthTx1* no período de 48 horas. E para Fbx-32 foram observadas diferenças significativas para os períodos de 48 e 96 horas, em comparação do grupo *BthTx1* com *Sham*. Porém fica evidente que essas diferenças detectadas no período de 48 e 96 horas, na comparação realizada, ocorreu devido à uma queda de expressão do grupo *Sham*. Já que ao mesmo tempo, quando comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas entre nenhum dos períodos do grupo *BthTx1*, para nenhuma das proteínas mencionadas acima.

O mesmo ocorreu para GDF-8, porém feitas comparações entre todos os períodos do grupo *BthTx1*, foram detectadas diferenças significativas somente entre 24 e 72 horas, e 24 e 96 horas, não influenciando no período de 48 horas. Sendo assim, mais uma vez a diferença encontrada em 48 horas na comparação entre o grupo *Sham* e *BthTx1* ocorreu devido à uma queda de expressão do grupo *Sham*.

Por fim, os resultados acima indicam que todas as diferenças significativas observadas entre os grupos *Sham* e *BthTx1*, ocorreram somente devido à queda de expressão dos animais do grupo *Sham*, já que a injeção de botropsina I não alterou os níveis dos *MRFs* MyoD e Myog, do fator GDF-8 e nenhum dos marcadores da via ubiquitina-proteassomo.

Na análise dos grupos tratados com botropsina II, foi possível observar que para MyoD ocorreu diminuição significativa do grupo *BthTx2* em comparação com o grupo *Sham* no período de 48 horas.

Para Myog, ocorreu diferença significativa entre os grupos *Sham* e *BthTx2* no período de 48 horas, mas novamente a diferença detectada nesse período, na comparação entre grupo *Sham* e *BthTx2*, ocorreu devido à uma queda de expressão do grupo *Sham*. Já que ao mesmo tempo, quando comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas entre nenhum dos períodos do grupo *BthTx2*.

Em relação à GDF-8 ocorreu queda significativa de expressão do grupo *BthTx2* no período de 24 horas, e aumento no período de 48 horas, que assim se manteve nos períodos subsequentes.

Para os marcadores da via ubiquitina-proteassomo, MuRF-1 e Fbx-32, ocorreu a diminuição significativa para ambos, 24 horas pós administração de toxina.

Os dados da análise da resposta muscular à injeção de botropsina II isolada, aparentemente indicam que ela é capaz de ativar a resposta regenerativa, pois apesar de terem sido observadas alterações significativas nas análises de MyoD e Myog somente nos períodos de 24 e 48 horas respectivamente, observa-se que os gráficos apresentam uma tendência de aumento nos primeiros três períodos, até que em 96 horas ocorre uma aparente estabilização.

Para ser possível comprovar a hipótese deveriam ser realizadas análises com períodos mais posteriores a 96 horas, para assim efetivamente observar se a expressão dos genes citados acima realmente se mantenha contínua.

Ao mesmo tempo em que a botropsina II aparenta ser capaz de ativar uma resposta regenerativa atrasada, ela não promove alterações na via ubiquitina-proteassomo nos períodos de 72 e 96 horas, considerados mais tardios do nosso modelo, e consequentemente não pode ser capaz de, isoladamente, causar as sequelas relacionados à acidentes botrópicos.

7.3 – Análise de função motora após injúria por veneno bruto de *Bothrops jararacussu*

Segundo Hebert & Xavier (1998) a marcha pode ser definida como um conjunto de movimentos rítmicos e alternados do tronco e extremidades visando a locomoção do corpo.

Para que a marcha ocorra de forma coordenada e eficiente, é necessária a manutenção do sistema nervoso central, sendo que qualquer alteração na integridade da postura corporal acarreta em seu comprometimento.

O envenenamento botrópico causa também, além das lesões musculares extensas, o processo de desnervação.

Sendo assim a análise funcional pode representar um excelente método de avaliação motora e sensitiva, após qualquer lesão que comprometa a integridade de marcha de maneira semelhante ao processo de desnervação, como por exemplo a lesão muscular (VAREJÃO *et al*, 2002).

Dessa maneira foi utilizado o sistema CatWalk, para realizar análise de função motora dinâmica de camundongos injetados com veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (BOZKURT *et al*, 2011).

Na comparação entre membros direitos dos animais do grupo *Sham* com o grupo *Bjussu*, para todos os parâmetros, foram observadas diferenças significativas para os períodos de pré-injúria e 3 horas após tratamento.

Levando em conta que a explicação mais plausível para a diferença encontrada no período de pré-injúria é a de que os animais de cada grupo já apresentavam diferenças individuais de marcha, podendo ser consideradas características intrínsecas dos animais (VANDEPUTTE *et al*, 2010), ou podendo levar em consideração que essa situação pode ser

considerada comum para vários outros fatores em animais de linhagem heterogênea (RICE & O'BRIEN, 1980; SHULIANG *et al*, 1993).

Já as quedas significativas encontradas no período de 3 horas após envenenamento para o membro direito do grupo *Bjussu*, podem ser consideradas como resultados “nulos”, indicando que os animais não realizaram apoio. Sendo possível caracterizar uma postura reflexiva à sensação dolorosa provocada pelo veneno e o edema subsequente.

Quando realizadas comparações entre os membros contralaterais dos grupos *Sham* e *Bjussu*, para os parâmetros *Comprimento de passada* e *Velocidade de balanço* observa-se aumentos significativos para o grupo *Bjussu* nos períodos de pré-injúria e 48 horas. Para o parâmetro de *Intensidade Máxima* ocorreu aumento no período de 24 horas e queda significativa nos períodos de pré-injúria e 3 horas.

Nas comparações entre o membro tratado e o contralateral dos animais do grupo *Sham*, para analisar se a lesão mecânica da injeção juntamente ao volume de solução salina 0,9% provocavam alguma alteração na função motora, foram observadas alterações significativas apenas para os parâmetros *Comprimento de Passada* (períodos de pré-injúria e 3 horas) e *Velocidade de Balanço* (pré-injúria, 3 e 48 horas).

Porém, mais uma vez ambos resultados podem ser explicados possivelmente pelas diferenças intrínsecas dos animais.

Na análise do parâmetro apoio foram observados aumentos significativos para o grupo *Bjussu* do membro contralateral em comparação ao grupo *Sham* nos períodos de 72 e 96 horas.

Segundo Iwata *et al* (2010), a recuperação funcional do músculo-esquelético ocorre previamente à regeneração estrutural, ao passo que é necessária 90% da força muscular para reestabelecer a locomoção normal. Em nosso estudo, não foram realizados teste de força muscular, porém os animais do grupo *Bjussu* apresentaram restituição de função motora 24 horas após tratamento, corroborando com a idéia de que o retorno da função precede a normalização da estrutura muscular, que ainda se apresentou afetada no período de 72h e 96 horas após lesão.

No entanto a escassez de dados dificulta promover qualquer discussão mais profunda acerca da relação entre recuperação morfológica e funcional do tecido muscular.

Os estudos de análise motora através do sistema *CatWalk* até o momento mostraram eficiência em modelos de dor (Gabriel *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2009), lesão de nervo isquiático (DEUMENS *et al.*, 2007; BOZKURT *et al.*, 2008), osteoartrite induzida (ANGEBY-MOLLER *et al*, 2008; FERREIRA-GOMES *et al*, 2008).

Em nosso estudo, pela primeira vez, o método foi utilizado para avaliar a função motora de animais com lesão muscular induzida por veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. Os parâmetros analisados apresentaram as maiores alterações relacionadas à incapacitação

funcional, principalmente no período de 3 horas pós-injúria, tendo apresentado um reestabelecimento de sua funcionalidade normal nos períodos subsequentes.

8 – CONCLUSÕES

- O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi capaz de promover a ativação molecular do processo regenerativo através da regulação de expressão das proteínas MyoD, Myog e GDF-8, que ocorreu até o período de 96 horas pós-injúria.
- No nosso modelo experimental, a injúria muscular induzida por veneno bruto de *Bothrops jararacussu* não causou alterações significativas nas proteínas Fbx-32 e MuRF-1, marcadoras da via ubiquitina-proteassomo. Dessa maneira, a via ubiquitina-proteassomo não participa das sequelas musculares causadas por acidentes botrópicos.
- A botropsina I isolada não foi capaz de promover alterações nas proteínas MyoD, Myog e GDF-8, que regulam o processo regenerativo, assim como também não causou alterações nos marcadores da via ubiquitina-proteassomo.
- A botropsina II isolada foi capaz de promover ativação molecular da resposta regenerativa, através de MyoD, Myog e GDF-8, mas assim como a botropsina I, também não foi capaz de promover alteração nos marcadores da via ubiquitina-proteassomo, Fbx-32 e MuRF-1.
- O método CatWalk foi capaz de mensurar as alterações da função motora dinâmica no nosso modelo de envenenamento por *Bothrops jararacussu* no período mais precoce, 3 horas após tratamento. Considerando os parâmetros analisados, os animais apresentaram assim uma recuperação de função motora à partir do período de 24 horas pós tratamento.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ÂNGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** **82**: 755–763, 2000.

ANGEY-MOLLER, K.; BERGE, O. G.; HAMERS, F. P. Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. **J Neurosci Methods**. v. 174, n. 1, p. 1-9, 2008.

ARRINGTON, E. D.; MILLER, M. D. Skeletal muscle injuries. **Orthopedic Clinics of North America**. v. 26, n. 3, p. 411-421, 1995.

ATTAIX, D.; VENTADOUR, S.; CODRAN, A.; BECHÉT, D.; TAILLANDIER, D.; COMBARET, L. The ubiquitin–proteasome system and skeletal muscle wasting. **Essays in Biochemistry** volume 41, 2005.

BALTGAVIN, K. A.; BERGER, F. G.; PEÑA, M. M. O.; DAVIS, J. M.; WHITE, J. P.; CARSON, J. A. Muscle wasting and interleukin-6-induced atrogen-1 expression in the cachectic Apc^{Min/+} mouse. **Pflugers Arch**. **457**: 989–1001, 2009.

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública** **19** (1):7-16, 2003.

BONI, A. P.; ZENI, A. L. B.; ALBUQUERQUE C. A. C. Effect of hydroalcoholic extract of *Tabernaemontana catharinensis* in mice experimentally inoculated with bothropic venom. **Rev. Bras. Farm.** 92(3): 176-185, 2011.

BOZKURT, A.; DEUMENS, R.; SCHEFFEL, J.; O'DEY, D. M.; WEIS, J.; JOOSTEN, E. A.; FÜRHMANN, T.; BROOK, G. A.; PALLUA, N. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. **Journal of Neuroscience Methods** **173**: 91–98, 2008.

BOZKURT, A.; SCHEFFEL, J.; BROOK, G. A.; JOOSTEN, E. A.; SUSCHEK, C. V.; O'DEY, D. M.; PALLUA, N.; DEUMENS, R. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral

nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. **Behavioural Brain Research**. v. 219, n.1, p. 55-62, 2011.

BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of *Pax* genes. **C. R. Biologies** **330**: 530–533, 2007.

CARSON, J. A.; BOOTH, F. W. Myogenin mRNA is elevated during rapid, slow, and maintenance phases of stretch-induced hypertrophy in chicken slow-tonic muscle. **Pflugers Arch**. v. 435, n. 6, p. 850-858, 1998.

CHAKRAVARTHY, M. V.; ABRAHA, T. W.; SCHWARTZ, R. J.; FIOROTTO, M. L.; BOOTH, F. W. Insulin-like Growth Factor-I Extends in Vitro Replicative Life Span of Skeletal Muscle Satellite Cells by Enhancing G1/S Cell Cycle Progression via the Activation of Phosphatidylinositol 3*-Kinase/Akt Signaling Pathway*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 275**, No. 46: 35942–35952, 2000.

CHARGÉ, S. B. P. & RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Ver** **84**: 209–238, 2004.

CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. **Journal of Protein Chemistry**, Volume 12, Issue 1: 57-64, 1993.

CORREA-NETO, C.; TEIXEIRA-ARAUJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon** **55**: 1222–1235, 2010.

DEUMENS, R.; JAKEN, R. J. P.; MARCUS, M. A. E.; JOOSTEN, E. A. J. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static gait changes after adult rat sciatic nerve resection. **Journal of Neuroscience Methods** **164**: 120–130, 2007.

DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P. T. C.; CRUZ-HOFLING, M. A. Low-level Laser Therapy Promotes Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Expression in Endothelial and Nonendothelial Cells of Mice Gastrocnemius Exposed to Snake Venom. **Photochemistry and Photobiology** **87**: 418–426, 2011.

FEDORUK, M. N. & RUPERT, J. L. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? **Scand J Med Sci Sports** **18**: 123–131, 2008.

FERREIRA-GOMES, J.; ADAES, S.; CASTRO-LOPES, J. M. Assessment of movement evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. **J Pain**. v. 9, n. 10, p. 945-954, 2008.

FLOSS, T.; HANS-HENNING, A.; BRAUN, T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. **GENES & DEVELOPMENT** **11**: 2040–2051, 1997.

FRY, B. G. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Cold Spring Harbor Laboratory Press** **15**:403–420, 2005.

GLICKMAN, M. H. & CIECHANOVER, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. **Physiol Ver** **82**: 373–428, 2002.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; HOFF, J. W. V. D. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT** **16**:857–868, 2007.

GUTIERREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A. C. O.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration after Injection of Bothropstoxin-II, a Phospholipase A2, Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops jararacussu*. **EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY** **55**: 217-229, 1991.

GUTIERREZ, J. M. & LOMONTE, B. PHOSPHOLIPASE A2 MYOTOXINS FROM *BOTHROPS* SNAKE VENOMS. **Toxicon**, Vol. 33, No. 11: 1405-1424, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; QUESADA, L.; LEÓN, G.; NÚÑES, J.; LAING, J. D.; SASA, M.; RENJIFO, J. M.; NASIDI, A.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G.; ROJAS, G. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an

alternative to the antivenom crisis in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **99**: 468-475, 2005.

GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARREL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Med.** **3**, p. e150, 2006.

GUTIERREZ, J. M.; WARREL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Volume 7 | Issue 6 | e2162, 2013.

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

HEBERT, S.; XAVIER, R.; Ortopedia e traumatologia. Princípios e prática. 3^a ed. Porto Alegre (RS): **Artmed**; 2003.

HILL, M.; GOLDSPINK, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **J. Physiol.** v. 549, p. 409-418, 2003.

HOLTERMAN, C. E. & RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Seminars in Cell & Developmental Biology** **16**: 575–584, 2005.

HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; SIMIONI-RODRIGUES, L.; GIGLIO, J. R. FRACTIONATION OF BOTHROPS JARARACUSSU SNAKE VENOM: PARTIAL CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BOTHROPSTOXIN. **Toxicon**, Vol. 26, No. 7: 613-627, 1988.

HOPKINS, P. Skeletal muscle physiology. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain** | Volume 6 Number 1, 2006.

IWATA, A.; FUCHIOKA, S.; HIRAOKA, K.; MASUHARA, M.; KAMI, K. Characteristics of locomotion, muscle strength, and muscle tissue in regenerating rat skeletal muscles. **Muscle & Nerve**, v. 41, n. 5, p. 694-701, 2010.

JOULIA, D.; BERNARDI, H.; GARANDEL, V.; RABENOELINA, F.; VERNUS, B.; CABELLO, G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. **Experimental Cell Research** **286**: 263–275, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica, 11^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILIPPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle Regeneration: Cellular and Molecular Events. **In vivo** **23**: 779-796, 2009.

KHARRAZ, Y.; GUERRA, J.; MANN, C. J.; SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CANOVES, P. Macrophage Plasticity and the Role of Inflammation in Skeletal Muscle Repair. **Mediators Inflamm.**: 491-497, 2013.

KOLLIAS, H. D. & MCDERMOTT, J. C. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol** **104**: 579–587, 2008.

LAING, G. D.; RENJIFO, J. M.; RUIZ, F.; HARRISON, F. A.; NASIDI, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROWLEY, P. D.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G. new Pan African polyspecific antivenom developed in response to the antivenom crisis in Africa. **Toxicon** **42**: 35–41, 2003.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.** **129**: 227–237, 1999.

LÉGER, B.; VERGANI, L.; SORARU, G.; HESPEL, P.; DERAIVE, W.; GOBELET, C.; D'ASCENZIO, C.; ANGELINI, C.; RUSSEL, A. P.; Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1. **FASEB J** **20**: 583–585, 2006.

MCFARLANE, C.; HENNEBRY, A.; THOMAS, M.; PLUMMER, E.; LING, N.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. **Experimental Cell Research** **314**, 317 – 329, 2007.

MCKAY, B. R.; O'REILLY, C. E.; PHILLIPS, S. M.; TARNOPOLSKY, M. A.; PARISE, G. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. **J Physiol** **586**: 5549–5560, 2008.

MEBS, D.; & OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.** Vol. 48: pp. 223-236, 1990.

MEGENEY, L. A.; KABLAR, B.; GARRETT, K.; ANDERSON, J. E.; RUDNICKI, M. A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **GENES & DEVELOPMENT** **10**:1173-1183, 1996.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO A.C.M; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** **47**: 304–312, 2006.

MESSA, S. P. EFEITO DO ALONGAMENTO INTERMITENTE NA EXPRESSÃO GÊNICA, NA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES E NA MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM RATOS. Tese (Doutorado em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – Universidade Federal de São Carlos, 2008.
MLANI, R.; JORGE, M. T.; CAMPOS, F. P. F.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L. C.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S.; SANO-MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDEZ, I. C. O. F.; FERNANDES, J. C.; ALDRED V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. G. D.; WARRELL, D. A. Snakebites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **Q. J. Med.** **90**: 323-334, 1997.

MILLIGAN, R. A. & FLICKER, P. F. Structural Relationships of Actin, Myosin, and Tropomyosin Revealed by Cryo-Electron Microscopy. **The Journal of Cell Biology**, Volume 105: 29-39, 1987.

MITCH, W. E. & GOLBERG, A. L. Mechanisms of Muscle Wasting. **The New England Journal of Medicine**, Volume 335 Number 25: 1897-1905, 1996.

MURAKAMI, M. T.; LOURENZONI, M. R.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Biochemical and Structural Investigations of Bothropstoxin-II, a Myotoxic Asp49 Phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* Venom. **Protein & Peptide Letters** **15**: 1002-1008, 2008

NUCHPRAYOON, I. & GARNER, P. Interventions for preventing reactions to snake antivenom (Review). **Cochrane Database Syst Rev** **2**: CD002153 [PubMed], 2000.

OLGUIN, H. C.; YANG, Z.; TAPSCOTT, S. J.; OLWIN, B. B. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 177, No. 5: 769–779, 2007.

PALLAFACHINA, G.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases** **23**: 12 – 18, 2013.

PATEL, K. & AMTHOR, H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade—new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders** **15**, 117–126, 2005.

PEAKE, J.; GATTA, P. D.; CAMERON-SMITH, D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** **298**:1485–1495, 2010.

QUEIRÓZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHINI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon** **22**:339-346, 1984.

QUEIROZ, L. S.; MARQUES, M. J. & SANTO-NETO, H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon** **40** (10):1483-1486, 2002.

RICE, M. C. & O'BRIEN, S. J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature** **283**: 157-161, 1980.

SHULIANG, C.; CHESSON, C.; HOPE, R. Genetic variation within and between strains of outbred Swiss mice. **Laboratory Animals** **27**: 116-123, 1993.

SEGURA, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; LEON, G.; HARRISON, R.; DURFA, N.; NASIDI, A.; CALVETE, J. J.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GUTIERREZ, J. M. Preclinical assessment of the efficacy of a new antivenom (EchiTab-Plus-ICP®) for the treatment of viper envenoming in sub-Saharan Africa. **Toxicon** **55**: 369–374, 2010.

SENF, S. M.; DODD, S. L.; MCLUNG, J. M.; JUDGE, A. R. Hsp70 overexpression inhibits NF-KB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. **FASEB J** **22**:3836–3845, 2008.

SCHERTZER, J. D. & LYNCH, G. S. Comparative evaluation of IGF-I gene transfer and IGF-I protein administration for enhancing skeletal muscle regeneration after injury. **Gene Therapy** **13**: 1657–1664, 2006.

SCHWARTZ, A. L. & CIECHANOVER, A. Targeting Proteins for Destruction by the Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 73–96, 2009.

TAILLANDIER, D.; COMBARET, L.; POUCH, MARIE-NOELLE; SAMUELS, S. E.; BECHET, D.; ATTAIX, D. The role of ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society** **63**: 357–361, 2004.

TAJBAKHSH, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. **Journal of Internal Medicine**. v. 266, p. 372-389, 2009.

TAKALA, T. E. & VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand J Med Sci Sports** **10**: 321–325, 2000.

TIDBALL, J. G.; BERCHENKO, E.; FRENETTE, J. Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury inflammation. **J Leukocyte Biol** **65**: 493-498, 1999.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in the muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, **288**: 345-353, 2005.

TINTIGNAC, L. A.; LAGIRAND, J.; BATONNET, S.; SIRRI, V.; LEBOVITCH, M. P.; LEBOVITCH, S. A. Degradation of MyoD Mediated by the SCF (MAFbx) Ubiquitin Ligase*. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** Vol. 280, No. 4: 2847–2856, 2005.

TOBIN, J. F.; CELESTE, A. J. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. **Current Opinion in Pharmacology** **5**:328 – 332, 2005.

VANDEPUTTE, C.; TAYMANS, JEAN-MARC; CASTEELS, C.; COUN, F.; NI, Y.; LAERE, K. V.; BAEKELANDT, V. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. **BMC Neurosci.** **11**, 92, 2010.

VAREJÃO, A. S.; CABRITA, A. M.; MEEK, M. F.; BULAS-CRUZ, J.; GABRIEL, R. C.; FILIPE, V. M.; MELO-PINTO, P.; WINTER, D. A. Motion of the foot and ankle during the stance phase in rats. **Muscle & Nerve.** v. 26, n. 5, p. 630-635, 2002.

VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; TROMBONE, A. P. F.; SANTANA, A. E.; BECHARA, G. H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine** **12**: 123–130, 2005.

VINCIGUERRA, M.; MUSARO, A.; ROSENTHAL, N. Regulation of Muscle Atrophy in Aging and Disease. Protein Metabolism and Homeostasis in Aging. **Landes Bioscience and Springer Science & Business Media**, 2010

VOMERO, V. U.; MARQUES, M. J.; NETO, H. S. Treatment with an anti-inflammatory drug is detrimental for muscle regeneration at *Bothrops jararacussu* envenoming: An experimental study. **Toxicon** **54**: 361–363, 2009.

WANG, H.; SPINNER, R. J.; SORENSON, E. J.; WINDEBANK, A. J. Measurement of forelimb function by digital video motion analysis in rat nerve transaction models. **J Peripher Nerv Syst.** v. 13, p. 92-102, 2008.

WARREN, G. L.; INGALIS, C. P.; LOWE, D. A.; ARMSTRONG, R. B. What Mechanisms Contribute to the Strength Loss That Occurs During and in the Recovery from Skeletal Muscle Injury? **J Orthop Sports Phys Ther**, Volume 32, Number 2, 2002.

WARREN, G. L.; SUMMAN, M.; GAO, X.; CHAPMAN, R.; HULDERMAN, T.; SIMEONOVA, P. P. Mechanisms of skeletal muscle injury and repair revealed by gene expression studies in mouse models. **J Physiol** **582**, 2: pp 825–841, 2007.

WEHLING, M.; CAI, B.; TIDBALL, J. G. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. **The FASEB Journal Volume** **14** No.1: 103-112, 2000.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon** **45**: 951–967, 2005.

WHITTEMORE, L. A.; SONG, K.; LI, X.; AGHAJANIAN, J.; DAVIES, M.; GIRGENRATH, S.; HILL, J. J.; JALENAK, M.; KELLEY, P.; KNIGHT, A.; MAYLOR, R.; O'HARA, D.; PEARSON, A.; QUAZI, A.; RYERSON, S.; TAN, X. Y.; TOMKINSON, K. N.; VELDMAN, G. M.; WIDOM, A.; WRIGHT, J. F.; WUDYKA, S.; ZHAO, L.; WOLFMAN, N. M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **300**: 965–971, 2003.

ZÁDOR, E.; DUX, L.; WUYTACK, F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. **J. Muscle Res Cel Motil.** v. 20, p. 395-402, 1999.

ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. P. Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** **39**: 1505-1513, 2001.

ZHANG, L.; RAJAN, V.; LIN, E.; HU, Z.; HAN, H. Q.; ZHOU, X.; SONG, Y.; MIN, H.; WANG, X.; DU, J.; MITCH, W. E. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. **The FASEB Journal** **Vol. 25**, 2011

10 – ANEXOS



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Caracterização da expressão das vias ubiquitina-proteassomo, fatores de transcrição miogênicos MyoD e Miogenina, gene da Miostatina durante a regeneração de músculo esquelético após injeção de veneno botrópico" (protocolo nº 3291-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling / Bruno Kenzo Kagawa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 17 de fevereiro de 2014.

Campinas, 17 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “ ***Caracterização da expressão das vias ubiquitina-proteassomo, fatores de transcrição miogênicos MyoD e Miogenina, gene da Miostatina durante a regeneração de músculo esquelético após injeção de veneno botrópico***”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Bruno Kenzo Kagawa

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): Maria Alice da Cruz-Höfling

Data: 06/06/16

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Caracterização da expressão das vias ubiquitina-proteassomo, fatores de transcrição miogênicos MyoD e Miogenina, gene da Miostatina durante a regeneração de músculo esquelético após injeção de veneno botrópico**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de Junho de 2016

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Bruno Kenzo Kagawa**
RG n.º 47.870.765-4

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Maria Alice da Cruz-Höfling**
RG n.º 3.012.506