

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Efeito do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* sobre a neutralização e regeneração da mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* em camundongos: estudo morfológico e funcional.

RENATA DE MOURA CUNHA

PROF^a DR^a MÁRCIA GALLACCI
ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).

Botucatu, SP

2012

RENATA DE MOURA CUNHA

Efeito do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* sobre a neutralização e regeneração da mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* em camundongos: estudo morfológico e funcional.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia).

**PROF^a DR^a MÁRCIA GALLACCI
ORIENTADORA**

**BOTUCATU - SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cunha, Renata de Moura.

Efeito do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* sobre a neutralização e regeneração da mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* em camundongos : estudo morfológico e funcional / Renata de Moura Cunha. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Márcia Gallacci

Capes: 21000000

1. Bothrops. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha. 3. Cobra – Veneno. 4. Soroterapia. 5. Antivenenos.

Palavras-chave: Compostos vegetais; Envenenamento botrópico; Mionecrose.

***Dedico este trabalho aos meus pais Roseli e Roberto, por
terem me dado estrutura e oportunidade para chegar aonde
cheguei***

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que jamais me desamparou e que me dá forças para seguir em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Roseli** e **Roberto**, pelo incentivo, carinho e amor que dedicaram a mim. Vocês me ensinaram a trilhar no caminho certo.

Ao meu noivo **Fábio**, que foi muito mais que um companheiro, soube compreender com paciência minhas ausências e me deu força para nunca desistir.

A minha querida orientadora **Profa. Dra. Márcia Gallacci**, por me ensinar a fazer este trabalho, e me incentivar nos momentos de dificuldade, você acreditou no meu potencial e com seu exemplo admirável me fez seguir confiante.

Agradeço ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira** pela colaboração no fornecimento dos extratos vegetais utilizados neste trabalho.

A **Profa. Dra. Maeli Dal-pai Silva**, que foi essencial no desenvolvimento do trabalho, profissional competente e admirável que me ajudou com seus conhecimentos sobre morfologia, e que me amparou nos momentos que mais precisei.

A **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus**, que se dedicou no desenvolvimento do trabalho, colaborando no aperfeiçoamento das técnicas morfológicas utilizadas neste estudo. Obrigada por tudo.

A **Profa. Dra. Lidia Raquel de Carvalho**, profissional prestativa que me ajudou com seus conhecimentos sobre Bioestatística.

Ao aluno do Curso de Ciências Biológicas, **Marcelo**, pela colaboração.

Ao **técnico Ricardo, do laboratório de Morfologia**, pela ajuda na realização dos experimentos morfológicos e pelas palavras de incentivo. Obrigada pela ajuda.

Aos meus colegas de mestrado, **Cicília, Fábio, Walter, Raquel, Paula e Carlos**, pela amizade construída nesses dois anos. Obrigada por contribuir com meu crescimento profissional.

Ao meu grande colega de mestrado, **Carlos**, por ter me ensinado e ajudado em todos os momentos. Sem sua ajuda eu não teria conseguido.

A minha grande colega de mestrado, **Paula**, por ter disposto seu tempo para me ajudar e me orientar. Seus conhecimentos foram de fundamental importância.

Aos **professores do programa de Mestrado em Farmacologia**, pelos ensinamentos.

A secretária do Departamento de Farmacologia, **Cristina**, pela atenção.

Aos meus amigos de trabalho, **Lilian, Luiz Gotardi, Evandro, Eliana, Márcia e todos os outros**, que sempre foram flexíveis nesta minha difícil jornada, e sempre souberam entender minhas ausências. Obrigada por estarem sempre do meu lado me ajudando.

"Desde que eu fui uma criança, tenho tido esse impulso instintivo por expansão e crescimento. Para mim, a função e dever de um ser humano de qualidade são o honesto e sincero desenvolvimento de seu potencial".

Bruce Lee

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que deus tem preparado para aqueles que o amam.”

1 Coríntios 2.9

“... somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou.”

Romanos 8.37

“Que a integridade e a retidão me protejam, porque a minha esperança está em ti.”

Salmo 25.21

RESUMO

Os acidentes botrópicos representam cerca de 87% dos envenenamentos ofídicos registrados no Brasil e se destacam pelas graves seqüelas que limitam a vida do acidentado. O principal efeito tóxico local destes é a mionecrose, que pode levar à perda tecidual permanente e à amputação. A mionecrose pode ser decorrente da isquemia do tecido muscular, causada por fatores hemorrágicos presentes nestes venenos (metaloproteases), ou da presença de miotoxinas (PLA₂s) que afetam diretamente o tecido muscular. O método mais eficaz para o tratamento dos envenenamentos ofídicos é a soroterapia passiva. No entanto, esta é limitada devido à relativa ineficácia do soro em neutralizar a mionecrose dos venenos botrópicos, além de muitas comunidades não terem acesso à soroterapia. Estes fatores conduzem a busca de métodos alternativos, como o uso de extratos vegetais. Evidências mostram que o extrato aquoso da *Casearia sylvestris*, conhecida popularmente como “guaçatonga”, é capaz de neutralizar efeitos tóxicos de venenos brutos e de suas miotoxinas isoladas. A *Casearia sylvestris* apresenta diversos outros efeitos terapêuticos como: anti-séptico, antiinflamatório, anestésico local, anti-tumoral, anti-úlceras e cicatrizante. Devido à escassez de estudos experimentais para avaliar a eficácia de extratos vegetais na redução dos danos locais ocasionados pelo envenenamento botrópico, torna-se importante avaliar a potencial atividade antiofídica da *Casearia sylvestris*. O presente estudo teve por objetivo investigar o uso do extrato aquoso da *Casearia sylvestris*, como terapêutica tópica dos efeitos locais do envenenamento botrópico experimental em camundongos. Foi avaliada a capacidade do extrato bruto da planta em neutralizar a mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* e/ou acelerar o processo de regeneração muscular. O estabelecimento da mionecrose e o processo regenerativo foram acompanhados por análise morfológica do músculo e avaliação funcional *in vivo* da resposta motora, realizada pelo teste da barra giratória. A observação do aspecto geral do músculo *in situ* e a análise histológica revelaram diminuição da lesão após 24 horas e 3 dias da administração do veneno no grupo que foi tratado com aplicação tópica diária do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (EACs).

Decorridos 14 e 21 dias da administração do veneno, a análise morfométrica mostrou menor frequência de fibras com áreas pequenas no grupo que foi tratado com o EACs. Estes resultados sugerem que, neste grupo experimental, os danos locais induzidos pelo veneno foram menores. Esta hipótese é corroborada pelas imagens obtidas por microscopia confocal que revelaram diminuição da dispersão de receptores de acetilcolina no grupo tratado com o extrato, após 21 dias do envenenamento experimental. Tais achados são compatíveis com a presença de fibras musculares maduras. Os resultados do estudo funcional também sugerem a parcial neutralização do veneno pelo extrato visto que, após 24 horas do envenenamento, já não se observou comprometimento da atividade locomotora do grupo tratado com o extrato, em relação ao grupo controle. Além disso, decorridos 7 dias, houve um aumento de fibroblastos e colágeno nos grupos que receberam o EACs. Em conclusão, nossos resultados mostram que o extrato aquoso da *Casearia sylvestris* protegeu, inicialmente, as fibras musculares do efeito miotóxico do veneno e estimulou a cicatrização posteriormente.

Palavras-chave: Compostos vegetais; Envenenamento botrópico; Mionecrose.

ABSTRACT

Bothrops accidents represent about 87% of snakebites recorded in Brazil and account for serious the consequences that affect the life of the victim with social and economic repercussions. Its main toxic effect is myonecrosis, which can lead to permanent tissue loss and amputation. Myonecrosis may result from muscle tissue ischemia, hemorrhage caused by factors present in these venoms (metalloproteases), or the presence of myotoxins (PLA₂s) that directly affect muscle tissue. The most effective treatment is passive serotherapy. However, this is limited due the relative ineffectiveness of the serum to neutralize the myonecrosis of Bothrops venoms and the lack of access to serotherapy by many communities. These factors lead to alternative methods such as the use of plant extracts. Evidence shows that the aqueous extract of *Casearia sylvestris*, known popularly as "guaçatonga", is able to neutralize the toxic effects of venom and their crude myotoxins isolated. *Casearia sylvestris* presents several other therapeutic effects such as, antiseptic, antiinflammatory, local anesthetic, anti-tumor, anti-ulcer and wound healing. Due to the scarcity of experimental studies to evaluate the efficacy of plant extracts in reducing the harm caused by Bothrops envenomation, it is important to evaluate the potential activity of antiophidic *Casearia sylvestris* as a complement to conventional serum therapy. The present study aimed to investigate the use of aqueous extract of *Casearia sylvestris*, topical therapy as complementary to local effects of Bothrops envenomation in experimental mice. We evaluated the ability of the crude extract of the plant to neutralize myonecrosis induced by the venom of Bothrops jararacussu and / or accelerate the process of muscle regeneration. The onset of myonecrosis and the regenerative process were characterized by morphological analysis of the muscle and functional evaluation of muscle motor response *in vivo*, conducted by rota-rod test. The observation of the general appearance of the muscle *in situ* and histological analysis revealed reduced injury after 24 hours and 3 days of administration of poison in the group treated with daily topical application of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (RCTs). After 14 and 21 days of administration of poison, morphometric

analysis showed a lower frequency of the amount of fibers with small areas in the group treated with ASCs. These results suggest that in this experimental group, local damage induced by poison was lower. This hypothesis is supported by the images obtained by confocal microscopy which showed decreased dispersion of receptors acetylcholine in the group treated with the extract after 21 days of experimental poisoning. These findings are consistent with the presence of mature muscle fibers. The study results also suggest the functional partial neutralization of the venom extract since after 24 hours of poisoning there was no impairment of locomotor activity of the extract-treated group, compared with the control group. In addition, after 7 days, there was an increase of fibroblasts and collagen in the groups receiving the RCTs. In conclusion, our results show that the aqueous extract of *Casearia sylvestris* protected initially muscle fibers from the myotoxic effect of the poison and subsequently stimulated healing.

Keywords: Vegetables compounds; Poisoning by bothrops; myonecrosis.

Lista de Abreviaturas, Siglas, Símbolos

ACh = acetilcolina

AChE = acetilcolinesterase

BthTX-I= bothropstoxina-I

Cs = *Casearia sylvestris*

Cl⁻ = cloro

DL₅₀ = concentração da toxina capaz de matar 50% da população testada

EACs = Extrato aquoso de *Casearia sylvestris*

EPM = erro padrão da média

g = grama

HE = hematoxilina eosina

i.m. = intramuscular

JNM= Junção Neuromuscular

M= molar

N = número de animais

PLA₂S = fosfolipases A₂

rpm = rotações por minuto

TA = tibial-anterior

VBBj = Veneno bruto de *Bothrops jararacussu*

µg = micrograma

µl = microlitro

µm² = micrometros

Lista de Ilustrações

	Página
Figura 1 Serpente <i>Bothrops jararacussu</i> .	3
Figura 2 Planta <i>Casearia sylvestris</i> .	9
Figura 3 Fotografia Macroscópica do músculo TA após 24 horas do envenenamento botrópico.	22
Figura 4 Fotografia Macroscópica do músculo TA após 3 dias do envenenamento botrópico.	23
Figura 5 Fotografia Macroscópica do músculo TA após 7 dias do envenenamento botrópico.	24
Figura 6 Fotografia Macroscópica do músculo TA após 14 dias do envenenamento botrópico.	25
Figura 7 Fotografia Macroscópica do músculo TA após 21 dias do envenenamento botrópico.	26
Figura8A Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos TA corados por hematoxilina & eosina.	29
Figura8B Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos TA corados por hematoxilina & eosina.	30
Figura8C Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos TA corados por hematoxilina & eosina.	31

Figura 9	Gráfico da Morfometria da frequência de classes de fibras musculares em corte transversal (μm^2) do músculo tibial anterior de camundongos.	34 e 35
Figura10	Microscopia eletrônica do músculo tibial anterior de camundongos.	37
Figura11	Visão geral através de microscopia confocal a laser dos receptores de acetilcolina do músculo tibial anterior marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina.	39
Figura12	Visão geral através de microscopia confocal a laser dos receptores de acetilcolina do músculo tibial anterior marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina.	40
Figura 13	Visão geral através de microscopia confocal a laser dos receptores de acetilcolina do músculo tibial anterior marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina.	41
Figura 14	Gráfico do Número de quedas dos camundongos no aparelho Rotarod.	43 e 44

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1 Análise das médias da área da fibra muscular dos grupos experimentais após 14 dias. 33

Tabela 2 Análise das médias da área da fibra muscular dos grupos experimentais após 21 dias. 33

Sumário

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes são um problema de saúde pública particularmente importante em países tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina (Gutiérrez *et al.*, 2006; Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2011). As principais vítimas são trabalhadores rurais jovens que vivem distantes dos Serviços de Saúde e que podem morrer antes de receber o tratamento adequado (Brasil, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2006). Os sobreviventes freqüentemente apresentam seqüelas físicas e psicológicas altamente incapacitantes (Kasturiratne *et al.*, 2008). Em função da dimensão dos efeitos sócio-econômicos sobre a população os acidentes ofídicos, recentemente, foram incluídos na lista de doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011).

A estimativa da incidência dos envenenamentos ofídicos, bem como, da morbidade e da mortalidade a eles associada não é precisa, já que freqüentemente estes acidentes não são notificados ou as informações são colhidas com omissões (Kasturiratne *et al.*, 2008). A última avaliação mundial indicou que no período de 1985 e 2007 ocorreram, anualmente, cerca de 420.000 acidentes ofídicos com 20.000 mortes (Kasturiratne *et al.*, 2008). No Brasil foram notificados, entre 2000 e 2007, 24.000 casos/ano (De Oliveira *et al.*, 2009). De acordo como o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, tais acidentes constituíram a segunda principal causa de intoxicações em humanos, com 20% dos casos registrados, sendo superados apenas por intoxicações provocadas por medicamentos com 30,9% das notificações em 2007 (Sinitox, 2009).

No Brasil, destacam-se os acidentes ofídicos causados por serpentes pertencentes à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae* cujos principais gêneros são: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Os acidentes botrópicos correspondem a cerca de 87,0% das notificações (De Oliveira *et al.*, 2009). As *Bothrops* são encontradas em todo território nacional e habitam ambientes úmidos como mata, áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de grandes cidades (Brasil, 1991). A espécie mais imponente do gênero é a *Bothrops jararacussu* (Fig. 1), encontrada desde o sul da Bahia até o noroeste do Rio Grande do Sul.



Figura 1- Serpente *Bothrops jararacussu*

Disponível em: (http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/.../Quadro%20da%20Miniatura.htm)

Os venenos botrópicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90%), em sua maioria toxinas ou enzimas com atividade tóxica. Entre as enzimas destacam-se: fosfolipases A₂, L-aminoácido-oxidases, hialuronidases, metaloproteinases, cininogenases, enzimas trombina-símile, além de várias esterases, endopeptidases e fosfatases (Devi, 1968; Iwanaga & Suzuki, 1979; Calvete *et al.*, 2009). A fração não-protéica dos venenos ofídicos é representada por carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e componentes inorgânicos como metais divalentes (Calvete *et al.*, 2009).

O envenenamento botrópico é caracterizado por sintomas locais incluindo dor de caráter progressivo, edema, hemorragia, dermatonecrose e mionecrose (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez *et al.*, 1989; França & Málaque, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). São observados também efeitos sistêmicos incluindo; distúrbios na cascata da coagulação sanguínea que podem precipitar a coagulação intravascular disseminada, hemorragias devido à destruição do endotélio vascular e, em casos graves, choque hipovolêmico e necrose renal aguda decorrente do depósito de mioglobina nos túbulos renais (Amaral *et al.*, 1985; Boer-lima *et al.*, 1997; França & Málaque, 2009).

O único tratamento oficial para os envenenamentos ofídicos ainda é a soroterapia passiva (Brasil, 1901 a e b; Calmette, 1907). Os soros antiofídicos são concentrados de imunoglobulinas obtidos por hiperimunização de diversos animais, principalmente eqüinos (Brasil, 2001). Estes soros têm ação restrita aos acidentes causados pelas espécies de serpentes cujos venenos foram utilizados no processo de hiperimunização (Brasil, 2001). Embora os soros neutralizem os efeitos sistêmicos dos envenenamentos ofídicos em geral, estes são ineficientes

na neutralização da mionecrose, permitindo que a difusão da peçonha aconteça, o que ocasiona o quadro de intensa lesão tecidual ao redor do local da picada (Cardoso *et al.*, 2003).

Deve-se ressaltar que a mionecrose promovida pelos venenos botrópicos é um efeito tóxico local severo, que pode levar à perda tecidual permanente e à amputação, desabilitando o acidentado (Gutiérrez & Lomonte, 1989 e 1995; Otero *et al.*, 2002). Tais efeitos constituem um problema importante, pois são desencadeados muito rapidamente após a inoculação do veneno o que dificulta a neutralização se o soro for administrado várias horas após o acidente. Frequentemente ocorrem complicações como infecções que complicam ainda mais o manejo deste quadro e nos casos graves podem desencadear a síndrome compartimental que requer fasciotomia (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez & Ownby, 2003).

A patogênese desta mionecrose é complexa e envolve a ação combinada de diferentes componentes do veneno, como toxinas hemorrágicas e fosfolipases A2 miotóxicas, bem como, a posterior liberação de mediadores da resposta inflamatória (Rosenberg, 1990; Ownby *et al.*, 1999; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez & Ownby, 2003).

As toxinas hemorrágicas, também denominadas hemorraginas, são enzimas proteolíticas do tipo metaloproteinases cuja atividade enzimática depende da presença do íon zinco no seu sítio ativo. Estudos bioquímicos indicam que as metaproteinases são capazes de degradar as proteínas que formam a lâmina basal dos capilares. Como consequência, o endotélio vascular sofre diversas alterações que culminam com a formação de rupturas ou “gaps” através dos quais

ocorre hemorragia. Esta hemorragia pode levar à isquemia do tecido muscular contribuindo para a instalação da mionecrose (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez & Ownby, 2003).

As miotoxinas são proteínas que afetam diretamente as células musculares originando lesão celular irreversível (Mebs, 1986; Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez & Ownby, 2003). Estas proteínas são estruturalmente semelhantes às enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂) que catalisam a hidrólise dos glicerofosfolipídeos de membrana, convertendo-os em ácidos graxos e lisofosfolipídeos (Van Deener & De Haas, 1963; Burke & Dennis, 2009). As PLA₂s miotóxicas apresentam baixo peso molecular (14 a 18 kDa) e elevada semelhança estrutural, sendo subdivididas em PLA₂s clássicas (cataliticamente ativas) e PLA₂ homólogas (cataliticamente inativas). As PLA₂s clássicas são enzimas dependentes de cálcio caracterizadas pela presença do resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49, sendo denominadas Asp49-PLA₂s (Kaiser *et al.*, 1990). As PLA₂s homólogas diferenciam-se das clássicas pela substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 por resíduos de lisina, serina, glutamina ou asparagina (ver Gallacci & Cavalcante, 2010 para revisão). De particular importância são as que apresentam um resíduo de lisina na posição 49, sendo estas conhecidas como Lys49-PLA₂s (Lomonte *et al.*, 2003). A presença do resíduo de lisina nesta posição inviabiliza a ligação do co-fator cálcio nas PLA₂s-Lys49 homólogas, conseqüentemente, estas proteínas são desprovidas de atividade enzimática (Gutiérrez & Ownby, 2003). Todavia, a despeito de serem cataliticamente inativas, as Lys49PLA₂, encontradas nos venenos botrópicos, induzem intensa mionecrose

através de um mecanismo Ca^{2+} -independente (Ownby *et al.*, 1999; Gutiérrez & Ownby, 2003; Lomonte *et al.*, 2003).

A gravidade dos efeitos locais dos envenenamentos botrópicos e as limitações da soroterapia na prevenção de tais efeitos elevam a importância do estudo de tratamentos complementares. As plantas medicinais representam importante fonte de compostos capazes de auxiliar no tratamento de envenenamentos ofídicos como terapêutica complementar para a soroterapia convencional (Soares *et al.*, 2004).

Ensaio biológicos, estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos reportam que aproximadamente 850 espécies de plantas apresentam ou podem apresentar atividade antiofídica (Soares *et al.*, 2004). Dentre estas plantas, encontra-se a *Casearia sylvestris* (família *Flacourtiaceae*), conhecida popularmente como “guaçatonga” (Fig. 2) (Borges *et al.*, 2001; Cavalcante *et al.*, 2007; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2008). Esta planta é encontrada em toda a América Latina e particularmente ao longo de toda a extensão do território brasileiro (Hack *et al.*, 2005). A *Casearia sylvestris* possui diversos efeitos terapêuticos conhecidos na medicina popular como: anti-séptico, antiinflamatório, anestésico local, anti-tumoral, anti-úlceras, cicatrizante, e anti-ofídico (Itokawa *et al.*, 1990; Basile *et al.*, 1990; Raslan *et al.*, 2002).

No tocante a atividade antiofídica, evidências experimentais revelaram que o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* inibe as atividades miotóxica, edematogênica e aumenta a taxa de sobrevivência dos ratos injetados com doses letais de diversos venenos botrópicos, após a pré-incubação com este extrato. Além disso, por meio deste mesmo tipo de estudo, foi observada uma inibição das

atividades hemorrágica e anticoagulante dos ratos injetados com diversos venenos botrópicos (Borges *et al.*, 2000, 2001).

O extrato aquoso de *Casearia sylvestris*, através de estudos *in vitro*, também mostrou inibição do bloqueio neuromuscular e de lesões musculares em ratos submetidos à ação de venenos botrópicos e crotálicos (Cavalcante *et al.*, 2007). Subsequentemente, Cintra-Francischinelli *et al.*, 2008 verificaram uma atividade antiofídica do extrato metanólico de *Casearia sylvestris*, onde se observou uma reversão do bloqueio neuromuscular e mionecrose induzidos pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e de sua maior toxina (BthTX-I). Da Silva *et al.*, 2008 indicaram que o ácido elágico (flavonóide), um princípio ativo encontrado na planta *Casearia sylvestris*, mostrou eficiência na inibição das atividades edematogênicas e miotóxicas provocadas por venenos bruto da *Bothrops jararacussu* e de suas miotoxinas PLA₂ (BthTX-I), o que sugere uma potencialidade desta planta como fonte de princípios ativos para o tratamento deste envenenamento.



Figura 2- *Casearia sylvestris*

Disponível em: (<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/guacatonga.html>)

Devido à escassez de estudos experimentais para avaliar a eficácia de extratos vegetais na redução dos danos locais ocasionados pelo envenenamento botrópico e suas seqüelas físicas e sociais, tornam-se importante avaliar a potencial atividade antiofídica do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* na neutralização da mionecrose promovida pelos venenos botrópicos, bem como a sua subsequente regeneração, com o intuito de complementar a soroterapia convencional.

OBJETIVO

Objetivo Geral:

Investigar a eficácia do extrato aquoso bruto da *Casearia sylvestris* como terapêutica tópica para os efeitos locais do envenenamento botrópico experimental em camundongos.

Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do extrato bruto da *Casearia sylvestris* sobre a evolução da mionecrose induzida pelo veneno bruto da *Bothrops jararacussu* através de abordagens morfológica (microscopia óptica, eletrônica e confocal) e funcional *in vivo* (teste da barra giratória).

MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (20-25g), machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu e mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12/12 h).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do IB, protocolo nº 324.

Os animais foram agrupados em:

- Controle (com administração i.m. de 50µl de salina).
- VBBj (Veneno bruto de *Bothrops jararacussu* na dosagem de 2µg/g i.m. dissolvidos em de 50µl de salina).
- EACs (Administração tópica de *Casearia sylvestris* bruta em extrato aquoso na proporção de 1:5 veneno/EACs, 1 vez ao dia/21 dias, após a administração i.m. de 50µl de salina).
- VBBj + EACs (Veneno bruto de *Bothrops jararacussu* na dosagem de 2µg/g i.m. dissolvidos em de 50µl de salina + administração tópica de *Casearia sylvestris* bruta em extrato aquoso na proporção de 1:5 veneno/EACs, 1 vez ao dia/21 dias).

2 - Drogas e Reagentes

Foram empregadas as seguintes drogas e reagentes: Veneno bruto liofilizado de *Bothrops jararacussu*; *Casearia sylvestris* bruta em extrato aquoso; Hematoxilina (Dinâmica); eosina (Dinâmica); α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175); Triton X-100 1% (Sigma T9284) e colagenase 1% (Tipo I-Sigma C-0130). O veneno da *Bothrops jararacussu* liofilizado foi cedido pelo Departamento de Farmacologia, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu. O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* foi cedido pelo Dr. Paulo Sérgio Pereira da Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Ribeirão Preto-SP, Brasil. Exsicatas da espécie (HPMU 531) foram depositadas no Herbário da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP, e identificadas pelo Dr. Chau Ming da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu.

3 - Indução da Mionecrose

A mionecrose foi induzida pela administração do veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2 μ g/g em 50 μ l de solução salina fisiológica) no músculo tibial anterior (TA) do membro esquerdo dos camundongos, de acordo com Melo & Ownby (1999).

4. Aspecto Geral do Músculo Tibial Anterior *in situ*

O aspecto geral do músculo tibial anterior *in situ* foi observado através de fotografias destes músculos após a administração do veneno e dos tratamentos para avaliar o grau da hemorragia e do edema nos grupos experimentais. Esta análise foi realizada nos períodos de 24 horas, 3, 7 14 e 21 dias.

5. Análise Morfológica sob Microscopia Óptica

Após a indução da mionecrose e do tratamento, o músculo tibial anterior foi submetido à avaliação Histológica no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu.

Fragmentos do músculo tibial anterior foram fixados em solução de *Bouin*, que consiste em 7,5 mL de ácido pícrico; 2,5 mL de formaldeído e 5 mL de ácido acético, e incluídos em historresina. Cortes transversais de 3 µm de espessura foram obtidos em micrótomo e submetidos a coloração hematoxilina e eosina (coloração HE) para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares através do sistema de análise de imagens computadorizado (Qwin, Leica Germany). Todos os grupos experimentais foram observados nos períodos de 24 horas, 3, 7 14 e 21 dias.

6. Análise Morfométrica da Área das Fibras Musculares

As preparações histológicas coradas com HE foram submetidas à análise semiquantitativa após 14 e 21 dias da administração do veneno e do tratamento. Em cada músculo foram analisados 4 campos microscópicos diferentes. A área das fibras foi medida nos quatro campos diferentes, com aproximadamente 200 fibras musculares em cada amostra, e estas fibras foram separadas em classes de áreas para avaliar a frequência de cada uma nos diferentes grupos. As diferentes classes de áreas de fibras foram representadas como porcentagem do número total de fibras medidas. Esta análise foi realizada utilizando um sistema de análise de imagens computadorizado (Leica Qwin, Germany).

7. Análise Ultra-estrutural sob Microscopia Eletrônica.

A avaliação ultra-estrutural foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu. Amostras do músculo tibial anterior foram fixadas por 4 horas em solução de *Karnovsky* com a seguinte composição: glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, tampão fosfato Sorensen 0,1 M, pH = 7,4. Posteriormente foram lavadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebidos em resina Epon. Cortes de 1,5 µm de espessura foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Tecnai Spirit-Fei Company). Esta avaliação foi feita após 14 dias da indução da mionecrose e do tratamento.

8. Análise de Receptores Nicotínicos na JNM sob Microscopia Confocal

Os músculos tibial-anterior dos antímeros esquerdos foram reduzidos à região que continha o ponto motor. Estes músculos foram fixados com paraformaldeído 2% e submetidos ao protocolo para marcação dos receptores de acetilcolina. Após fixação por 15 min, os fragmentos musculares foram lavados com PBS (14 g de fosfato de sódio monobásico, 4,3 g de fosfato de potássio dibásico anidro e 72 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada, pH 7.5) várias vezes e, com o objetivo de se inativar o fixador foram incubados com glicina 0,1 M por 20 min em agitador orbital. Após lavagem com PBS os músculos foram incubados com collagenase 1% (Tipo I-Sigma C-0130) por 20 min no agitador, para que o tecido conjuntivo que restava preso ao músculo se desprendesse. A seguir foram lavados com PBS e os nAChRs foram marcados com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175,1: 1000 em PBS) durante 30 min no agitador. Após este período, os músculos foram lavados com PBS e incubados com Triton X-100 1% (Sigma T9284) durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares e posteriormente foram montados em lâmina sob lamínula.

Os receptores de acetilcolina marcados com α -bungarotoxina associada à rodamina dos músculos tibial anterior dos grupos estudados, foram observados utilizando-se o microscópio confocal de varredura a laser (Leica ® -TCS-SP5) integrado a um microscópio invertido de fluorescência DABCO – (Sigma). Para a

microscopia confocal foram utilizadas as objetivas de 20X e de 40X com imersão em óleo. A linha de 568nm foi utilizada para excitar a rodamina. O brilho e o contraste foram mantidos constantes para todos os grupos. Imagens de um único plano focal ou de grupo de imagens de vários planos focais foram adquiridas com auxílio do software do fabricante e salvas em um disco óptico. Esta observação foi realizada nos períodos de 24 horas, 7, e 21 dias da indução da mionecrose e tratamento.

9- Estudo Funcional *in vivo* (Teste da Barra Giratória- Rotarod)

O procedimento da barra giratória avalia a integridade do sistema motor. O procedimento consistiu em colocar o animal sobre uma barra que gira a uma velocidade fixa (15 r.p.m.) e avaliar o número de quedas que o animal teve em um determinado tempo. (DUNHAM *et al.*,1957).

Antes de realizar os experimentos, os camundongos foram treinados diariamente por um período de 180 segundos, durante 5 dias no cilindro rotativo (15 rpm). Um, 3, 7, e 21 dias após a injeção de 2,0 µg/g de veneno sozinho ou com os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de rotarod e o número de quedas que o animal teve foi registrado no período de 180 segundos. O tratamento com EACs foi aplicado uma vez ao dia para os grupos tratamento, incluindo uma primeira aplicação 5 minutos após a injeção do veneno.

10. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos realizados no estudo funcional *in vivo* foram agrupados em média e erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise estatística utilizando-se a análise de variância (ANOVA), para a comparação dos grupos experimentais. A análise foi complementada através do teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer*. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Para a análise da distribuição de freqüências da área das fibras foi utilizado o teste de Goodmam, onde cada grupo experimental foi alocado em uma coluna. Este teste mostra as comparações entre colunas de uma tabela, apontando assim, as diferenças entre estas colunas.

RESULTADOS

1. Aspecto Geral do Músculo Tibial Anterior *in situ*

As figuras de 3 a 7 ilustram, ao longo de 21 dias, o aspecto geral *in situ* do músculo tibial-anterior de camundongos submetidos ao envenenamento experimental com dose única do veneno da *Bothrops jararacussu* (2µg/g, i.m.). Decorridas 24 horas da administração do veneno constatou-se o estabelecimento de extensa mionecrose, caracterizada por edema e hemorragia local (Fig.3C). Após 3 dias, um aspecto semelhante, porém menos intenso, foi observado (Fig.4C). A partir do sétimo dia, o processo de regeneração torna-se evidente com progressiva redução do edema e da hemorragia local, evoluindo assim, até o décimo quarto dia (Figs.5C e 6C). Ao vigésimo primeiro dia o músculo apresenta aspecto normal (Fig. 7C).

A administração tópica do EACs (1:5 veneno/EACs, 1 vez ao dia/21 dias), reduziu parcialmente os efeitos tóxicos locais do veneno (Figs 3D a 7D). Após 24 horas, 3 e 7 dias, constatou-se diminuição do edema e da hemorragia (Figs 3D a 5D), quando comparados ao grupo veneno. A partir do décimo quarto dia, os músculos submetidos ao tratamento com o EACs já apresentaram um aspecto normal (Figs 6D e 7D).

Deve se ressaltar que o grupo experimental controle (Figs 3A a 7A), que recebeu apenas salina (50µl, i.m.), bem como o grupo EACs (Figs 3B a 7B), que recebeu salina (50µl, i.m.) e aplicação tópica de EACs, apresentaram músculos com aspecto macroscópico normal em todos os períodos analisados.



Figura 3. Aspecto geral *in situ* do músculo tibial anterior de camundongos após 24 horas da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle (grupo salina 24 horas) exibindo aspecto normal. (B) (grupo salina + EACs 24 horas) exibindo aspecto normal. (C) (grupo veneno 24 horas) Nota-se a presença de mionecrose, com extensa hemorragia e edema. (D) (grupo veneno + EACs 24 horas) Nota-se a presença de mionecrose, com menor grau de hemorragia e edema, quando comparados com o grupo veneno. N de 3 por grupo.

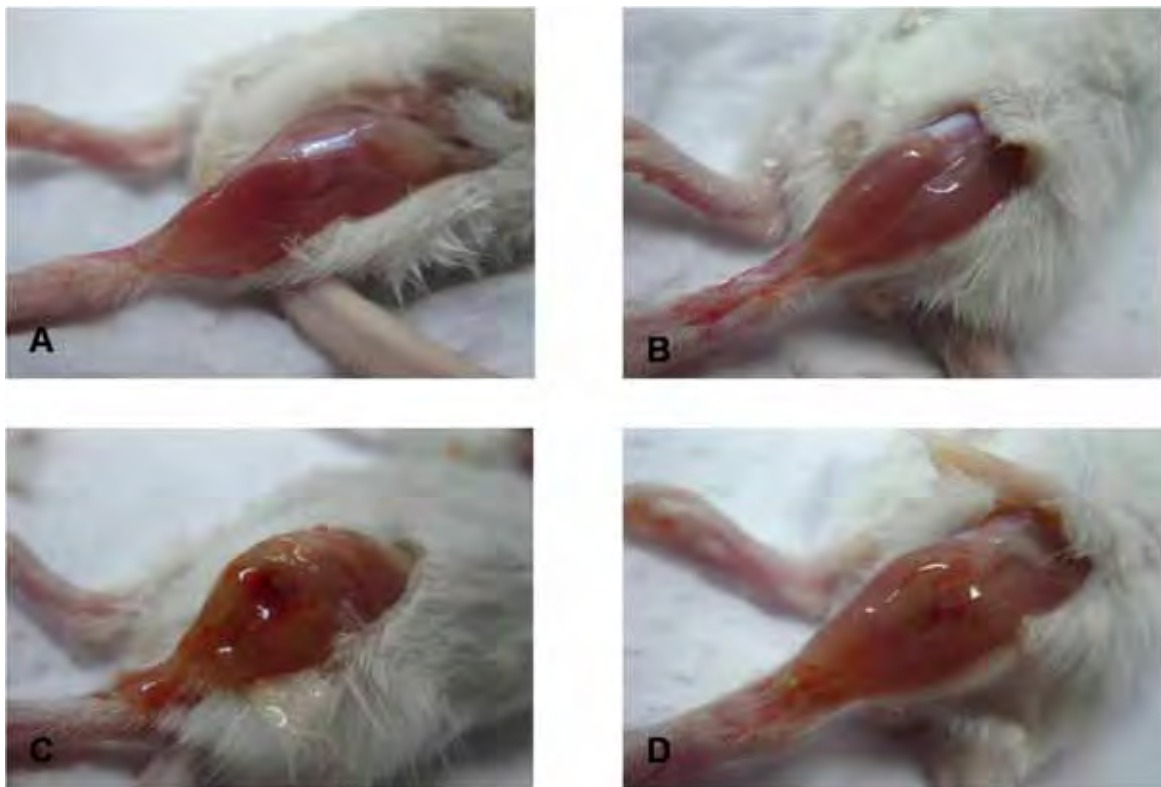


Figura 4. Aspecto geral *in situ* do músculo tibial anterior de camundongos após 3 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle (grupo salina 3 dias) exibindo aspecto normal. (B) (grupo salina + EACs 3 dias) exibindo aspecto normal. (C) (grupo veneno 3 dias) Nota-se intensidade menor de mionecrose, com pouca hemorragia e edema local, considerando que o músculo já começou o processo de regeneração. (D) (grupo veneno + EACs 3 dias) Nota-se a presença de pouca mionecrose, com menos hemorragia e edema que o grupo veneno 3 dias. N de 3 por grupo.

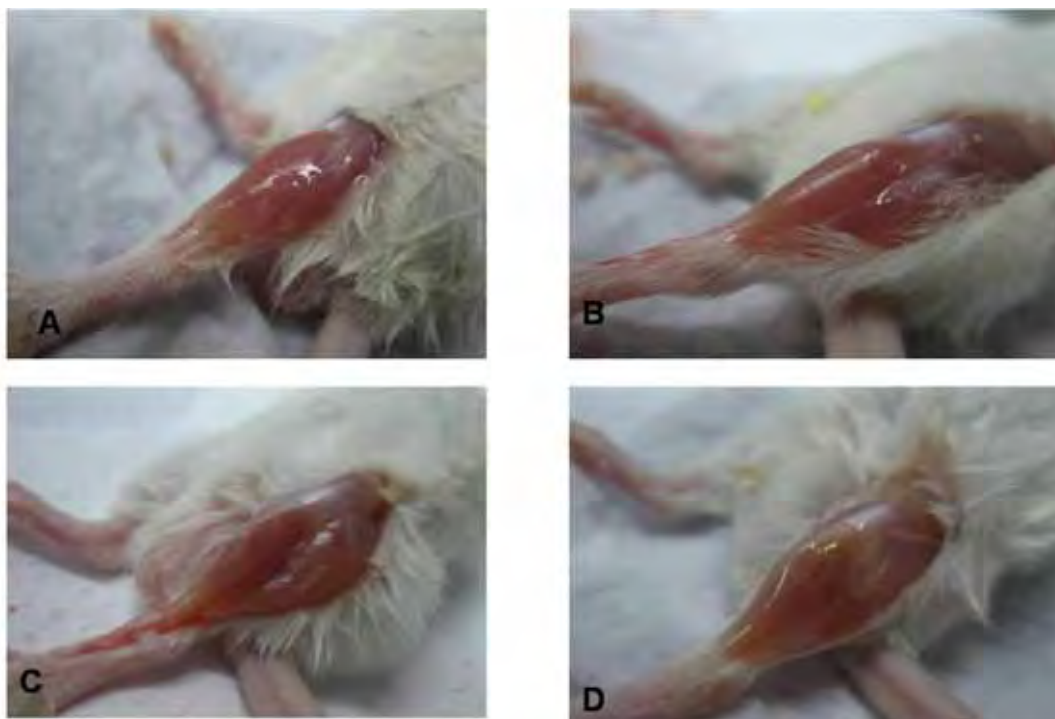


Figura 5. Aspecto geral *in situ* do músculo tibial anterior de camundongos após 7 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle (grupo salina 7 dias) exibindo aspecto normal. (B) (grupo salina + EACs 7 dias) exibindo aspecto normal. (C) (grupo veneno 7 dias) Nota-se redução progressiva da mionecrose, com o músculo sem hemorragia e sem edema local, considerando que o músculo está em processo de regeneração. (D) (grupo veneno + EACs 7 dias) Nota-se a redução progressiva da mionecrose, considerando que o músculo já está praticamente cicatrizado. N de 3 por grupo.

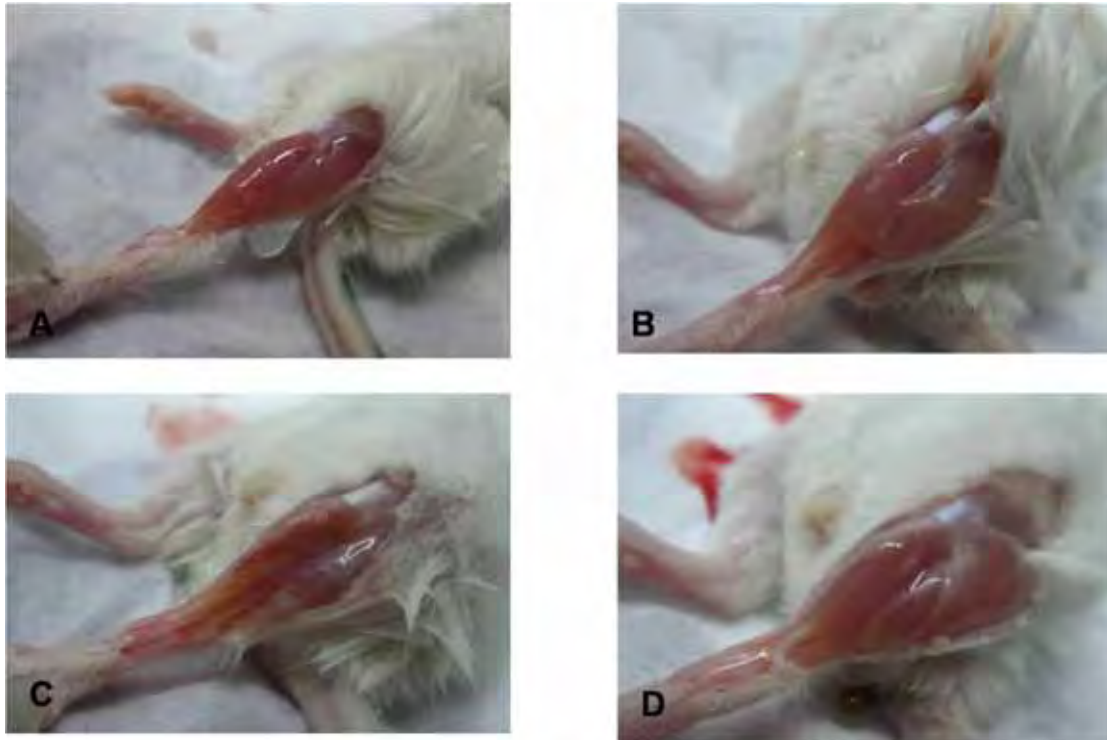


Figura 6. Aspecto geral *in situ* do músculo tibial anterior de camundongos após 14 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle (grupo salina 14 dias) exibindo aspecto normal. (B) (grupo salina + EACs 14 dias) exibindo aspecto normal. (C) (grupo veneno 14 dias) Nota-se redução progressiva da mionecrose, com o músculo sem hemorragia e sem edema local, considerando que o músculo está terminando o seu processo normal de regeneração e cicatrização. (D) (grupo veneno + EACs 14 dias) Nota-se a ausência de mionecrose, com o músculo já exibindo seu aspecto normal. N de 3 por grupo.

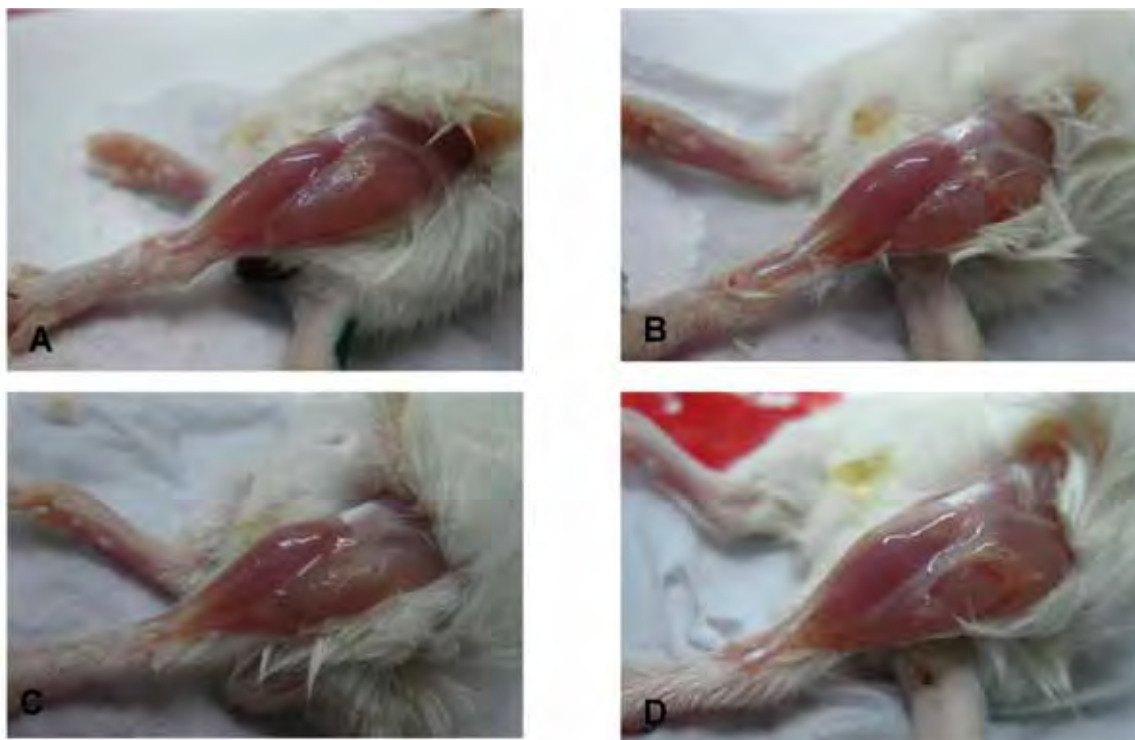


Figura 7. Aspecto geral *in situ* do músculo tibial anterior de camundongos após 21 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle (grupo salina 21 dias) exibindo aspecto normal. (B) (grupo salina + EACs 21 dias) exibindo aspecto normal. (C) (grupo veneno 21 dias) Nota-se a ausência de mionecrose, com o músculo já exibindo seu aspecto normal. (D) (grupo veneno + EACs 21 dias) Nota-se a ausência de mionecrose, com o músculo já exibindo seu aspecto normal. N de 3 por grupo.

2. Microscopia Óptica

2.1. Análise qualitativa do músculo tibial-anterior

Os grupos controle e EACs apresentaram, após 24 horas, aspecto histológico normal com presença de fibras poligonais com núcleos periféricos e organizadas em fascículos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório (Figs. 8a e 8b). Aspecto semelhante foi observado no decorrer de todo o período experimental para os músculos de ambos os grupos (dados não mostrados).

Após 24 horas, o grupo veneno mostrou intenso edema e infiltrado inflamatório com neutrófilos dispersos por entre as fibras (Figura 8 c). Estas por sua vez, apresentavam-se desorganizadas, com formato arredondado e sem núcleo. Neste mesmo período experimental, os músculos do grupo veneno + EACs mostraram-se mais conservados, com menos edema e infiltrado inflamatório discreto quando comparados ao grupo veneno. (Figura 8 d).

A partir do terceiro dia notou-se em ambos os grupos, veneno e veneno + EACs, a redução do processo inflamatório com diminuição do infiltrado inflamatório e do edema. Observou-se também a presença de algumas células musculares pequenas, basófilas e com núcleo central (Figura 8e e 8f).

Após 7 dias, os grupos veneno e veneno + EACs apresentaram edema e infiltrado inflamatório bem menores que nos períodos anteriores. No grupo veneno observou-se uma grande quantidade de células pequenas com núcleo central, evidenciando intenso processo de regeneração tecidual (Figura g). Em contraste, o grupo veneno + EACs exibiu um grande número de fibras maiores com aspecto poligonal e núcleo periférico, sugerindo, possivelmente, a menor extensão do

processo necrótico. Constatou-se também, moderada presença de células musculares pequenas com núcleo centralizado, indicando regeneração tecidual, além da presença de numerosos fibroblastos com produção de colágeno (Figura h).

Aos 14 dias do envenenamento, em ambos os grupos (veneno e veneno + EACs) ainda se observa a presença de algumas células em regeneração, com pequeno diâmetro e núcleo central, porém a maioria das fibras já apresenta aspecto poligonal normal (Figuras 8 i e 8 j). Neste mesmo período, observou-se a presença de numerosos fibroblastos com produção de colágeno, somente nos grupos veneno+EACs (Figura 8 j).

Aos 21 dias, os grupos veneno e o veneno + EACs, apresentaram a maioria das fibras musculares com aspecto morfológico normal. (Figuras 8 L e 8 m). Neste período, uma grande quantidade de colágeno entre as fibras musculares ainda era observada no grupo veneno + EACs, embora houvesse redução do número de fibroblastos (Figura 8m).

No sentido de avaliar a influência da frequência da administração do EACs sobre a formação de fibroblastos e colágeno foi desenvolvido, adicionalmente, 1 grupo experimental, no qual o EACs foi aplicado topicamente uma única vez após a administração do veneno (1^o dia). Neste caso, também se observou após 14 dias intensa proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Fig. 8n). Entretanto, aos 21 dias, não se constatou a presença de fibroblastos e de colágeno, e sim, de fibras musculares com seu aspecto morfológico normal (Fig. 8o).

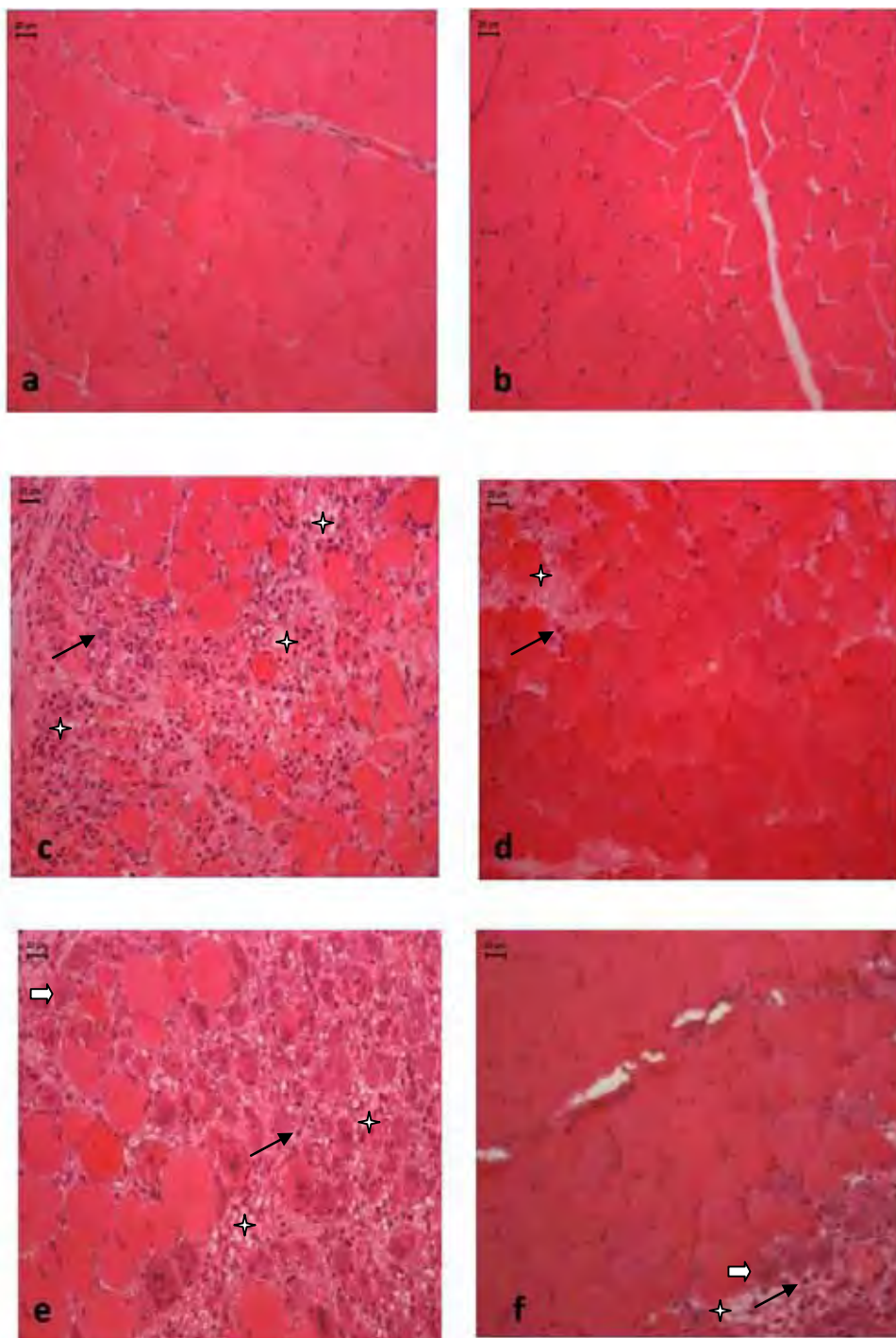


Figura 8A . Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos tibial anterior corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 40x). (a) Músculo controle, grupo salina 24 horas, exibindo morfologia normal. (b) Grupo salina + EACs 24 horas, exibindo morfologia normal. (c) Grupo veneno 24 horas mostrando maior grau de mionecrose, infiltrado inflamatório e edema. (d) Grupo veneno + EACs 24 horas demonstra diminuição do edema, do infiltrado inflamatório e menor grau de mionecrose. (e) Grupo veneno 3 dias observa-se menos infiltrado inflamatório, mas evidente edema e mionecrose, e presença de células pequenas com núcleo central (f) Grupo veneno + EACs 3 dias nota-se menos infiltrado inflamatório, edema e mionecrose, e presença de algumas células pequenas arredondadas e com núcleo central mostrando início da regeneração. N de 5 por grupo. (→) Indica infiltrado inflamatório. (⇨) Indica célula arredondada, basófila e com núcleo central. (*) indica edema entre as células.

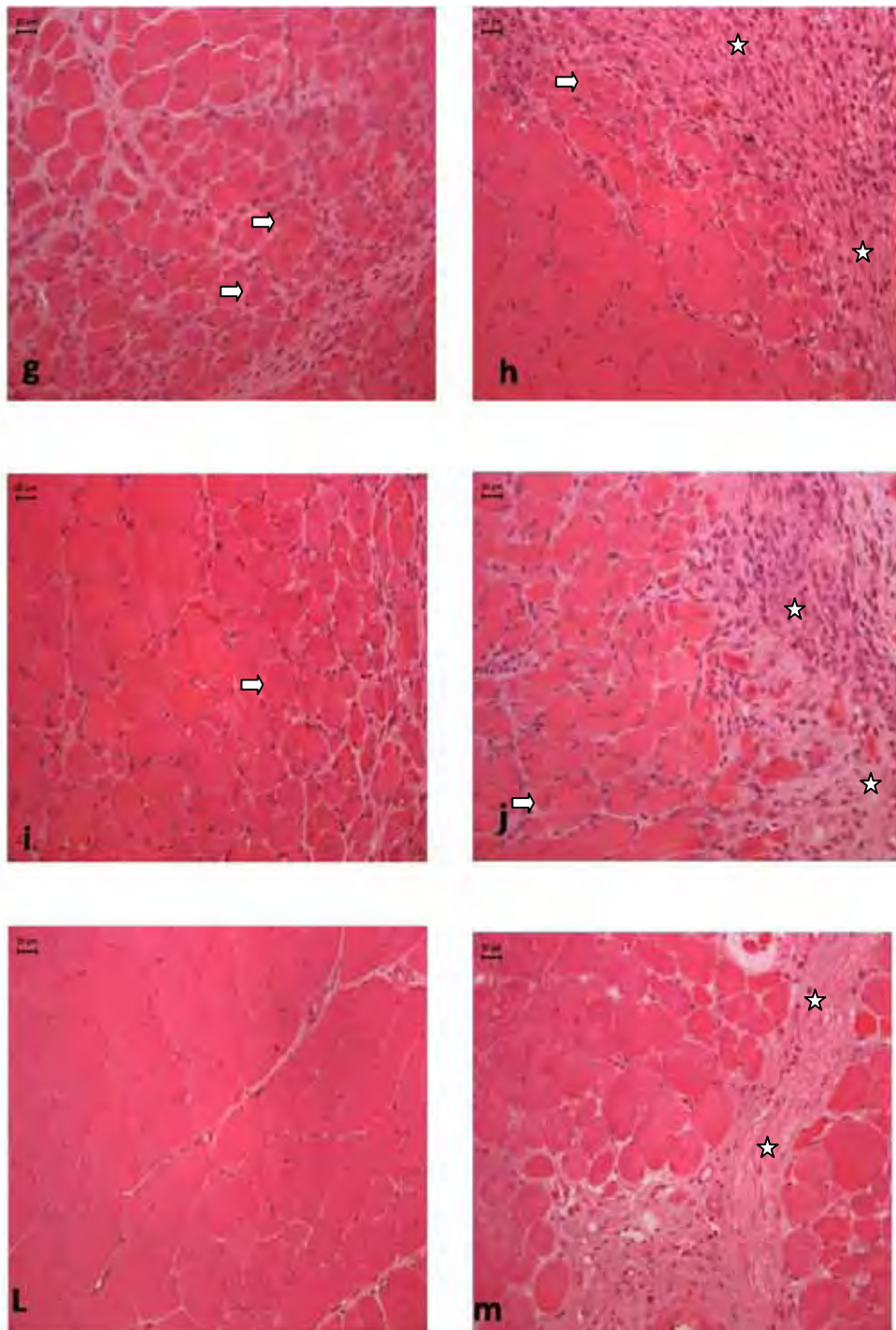


Figura 8B . Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos tibial anterior corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 40x). (g) Grupo veneno 7 dias pouco infiltrado inflamatório e presença de várias células pequenas e com núcleo central. (h) Grupo veneno + EACs 7 dias, presença de algumas células arredondadas e com núcleo central e proliferação de fibroblastos e colágeno. (i) Grupo veneno 14 dias mostra poucas células pequenas com núcleos centrais, e bastante células com seu aspecto normal poligonal e núcleo periférico, indicando processo de regeneração. (j) grupo veneno + EACs 14 dias mostra poucas células com núcleo central, várias com seu aspecto normal e núcleo periférico, mas ainda com bastante proliferação de fibroblastos e produção de colágeno. (L) Grupo veneno 21 dias mostra a maioria das células com seu aspecto normal poligonal e núcleo periférico, mostrando regeneração muscular. (m) Grupo veneno + EACs 21 dias mostra várias células com seu aspecto normal, mais intensa presença de colágeno, demonstrando aumento no processo cicatricial neste grupo com o tratamento. N de 5 por grupo. (⇒) Indica célula arredondada, basófila e com núcleo central. (☆) Indica presença de fibroblastos com colágeno.

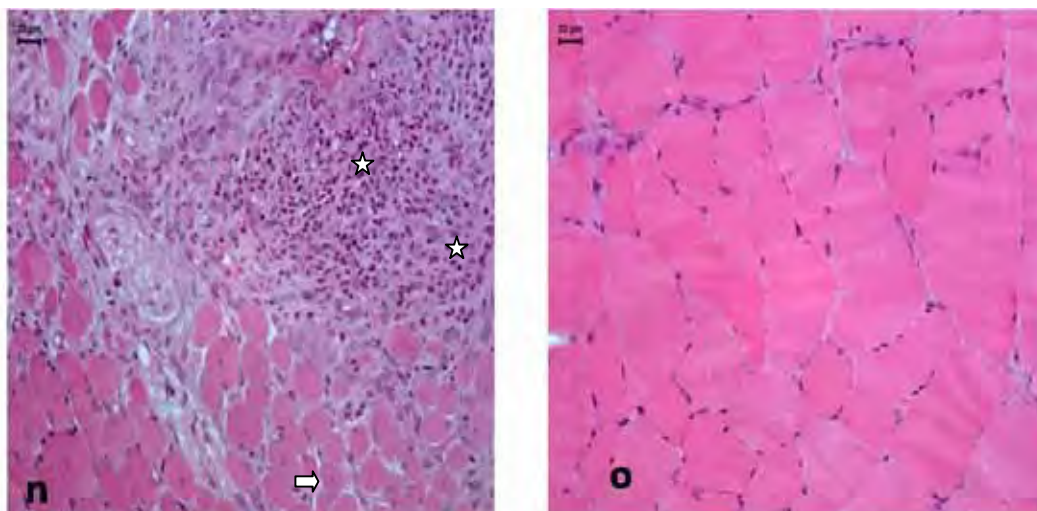


Figura 8C. Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos tibial anterior corados por hematoxilina & eosina (aumento original, 40x). (n) grupo veneno + EACS 14 dias, com aplicação tópica do extrato de Cs somente após a administração do veneno (1^o dia), mostra algumas células pequenas basófilas com núcleo central, mas ainda com bastante proliferação de fibroblastos e produção de colágeno. (o) Grupo veneno + EACS 21 dias, com aplicação tópica do extrato de Cs somente após a administração do veneno (1^o dia), mostra a maioria das células com seu aspecto normal poligonal e núcleo periférico, mostrando regeneração muscular. N de 5 por grupo. (☆) Indica presença de fibroblastos com colágeno. (⇨) Indica célula arredondada e com núcleo central.

2.2. Análise morfométrica da área das fibras

As tabelas 1 e 2 mostram a média da área das fibras musculares após 14 e 21 dias em todos os grupos experimentais. Em ambos os períodos, observou-se que a área das fibras foi significativamente menor no grupo veneno quando comparado aos grupos controle (salina) e EACs (tabs. 1 e 2). Já, o grupo veneno + EACs apresentou área das fibras maiores quando comparado ao grupo veneno (tabs. 1 e 2). Após 14 dias, não se observou diferença significativa entre as áreas das fibras dos grupos controle e EACs (tab. 1). No entanto, decorridos 21 dias constatou-se aumento significativo da área das fibras do grupo EACs em relação ao grupo controle (tab. 2).

As frequências de distribuição das fibras musculares após 14 e 21 dias estão ilustradas nas figuras 9A e 9B. Observou-se, após 14 dias, que o grupo veneno apresentou um maior número de fibras com áreas pequenas ($0-800 \mu\text{m}^2$), e um menor número de fibras com áreas médias e grandes ($1800-5000 \mu\text{m}^2$) quando comparados aos demais grupos. Já, o grupo veneno + EACs apresentou um menor número de células pequenas ($0-800\mu\text{m}^2$) e um maior número de células médias e grandes ($1800-5000 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo veneno (Fig. 9A).

Aos 21 dias verificou-se que o grupo veneno ainda apresentava um número maior de fibras com áreas pequenas ($0-1000 \mu\text{m}^2$) e um menor número de fibras com áreas grandes ($2000-5000 \mu\text{m}^2$) em relação aos grupos controle e EACs. O grupo veneno+EACs apresentou menor número de fibras pequenas nos intervalos ($0-600\mu\text{m}^2$) e ($800-1000\mu\text{m}^2$) e maior número de fibras grandes ($3000-5000 \mu\text{m}^2$)

em relação ao grupo veneno (Fig. 9B). Neste período, também foi evidente o aumento do número de fibras grandes apresentado pelo grupo EACs quando comparado ao grupo controle (Fig. 9B).

Tabela 1. Análise das médias da área da fibra muscular dos grupos experimentais após 14 dias.

TRATAMENTO 14 DIAS	SALINA	EACs	VENENO	VENENO + EACs
média ± epm (N)	2241±47 (575)	2356±37 (774)	860±20* (651)	1731±33* [#] (812)

* diferença em relação à salina (controle).

[#] diferença em relação ao veneno.

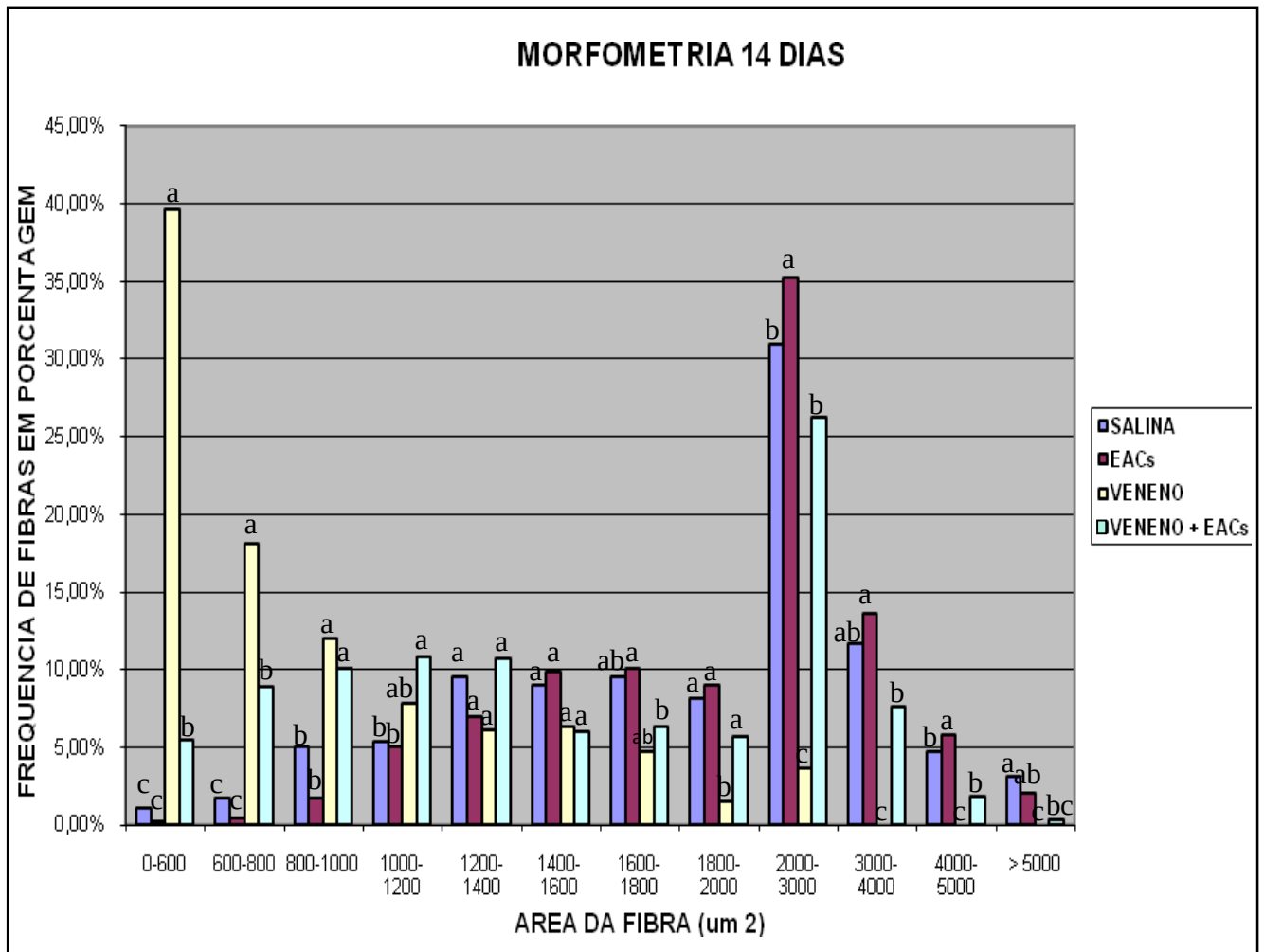
Tabela 2. Análise das médias da área da fibra muscular dos grupos experimentais após 21 dias.

TRATAMENTO 21 DIAS	SALINA	EACs	VENENO	VENENO + EACs
média ± epm (N)	2176±29 (823)	2677±45* (665)	1493±27* (856)	2078±39 [#] (962)

* diferença em relação à salina (controle).

[#] diferença em relação ao veneno.

A



B

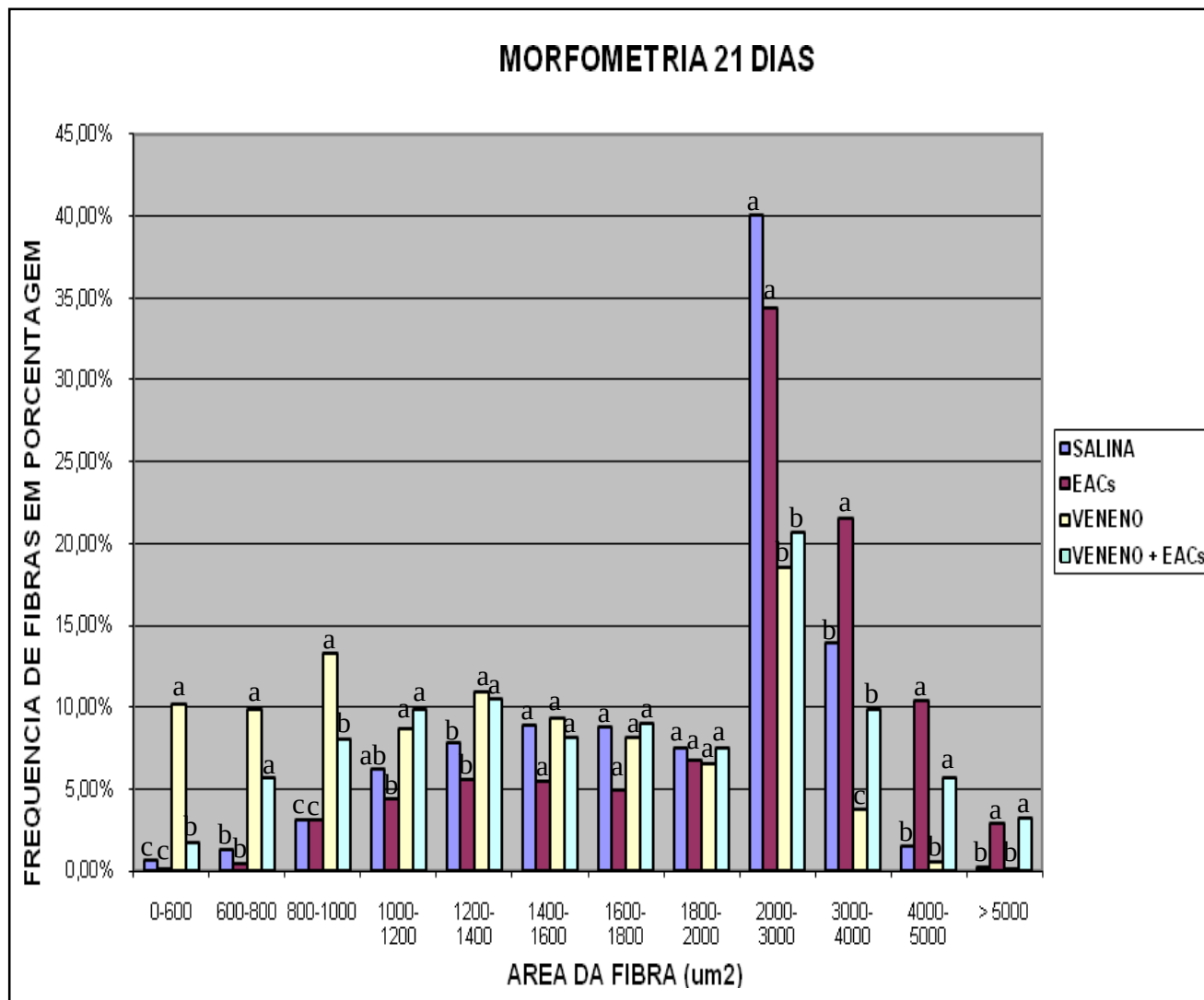


FIGURA 9. Efeito da aplicação tópica do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (1:5 veneno/EACs, 1 vez ao dia/21 dias) sobre a distribuição de freqüência de fibras em corte transversal (μm^2) do músculo tibial anterior de camundongos após 14 (A) e 21 dias (B) da mionecrose induzida pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* ($2\mu\text{g/g}$ i.m.). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre todos os grupos. Teste de goodman ($P < 0.05$).

3. Microscopia Eletrônica do Músculo Tibial Anterior

A análise ultraestrutural do músculo tibial anterior foi realizada após 14 dias da administração do veneno. Os grupos controle e EACs mostraram a maioria das fibras com características morfológicas normais, com miofibrilas bem organizadas, mitocôndrias preservadas e membrana plasmática com aspecto regular (Fig. 10 A e B).

No músculo tibial anterior dos animais que receberam injeção de VBBj observou-se fibras musculares em vários graus de regeneração: foi freqüente a presença de fibras pequenas, com citoplasma sem miofibrilas e áreas já apresentando miofibrilas organizadas em sarcômeros; as fibras apresentaram núcleos com cromatina frouxa e em algumas fibras os núcleos estavam localizados mais internamente (Fig. 10 C e D). No músculo dos animais que receberam VBBj + EACs também foram observadas fibras musculares em vários graus de regeneração, porém, foi freqüente a presença de áreas com fibroblastos e grande quantidade de fibras de colágeno (Fig. 10 E e F).

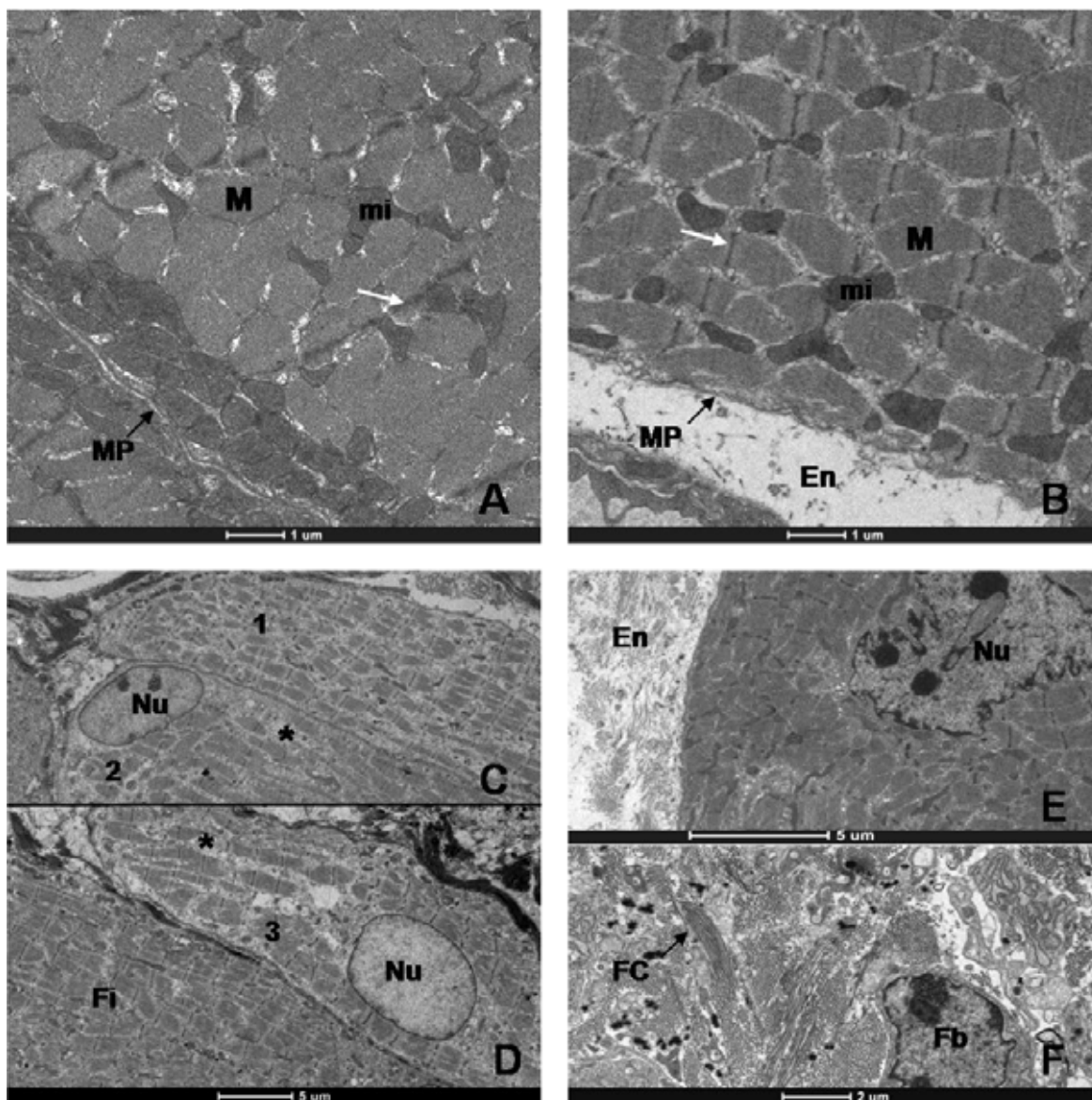


Figura 10 – Eletro micrografia do músculo tibial de camundongo, após 14 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2μg/g i.m.) **A:** Grupo Controle. **B:** Grupo EACs. Miofibrilas (M); mitocôndrias (mi); membrana plasmática (MP); endomísio com tecido conjuntivo frouxo em **B** (En).; linha Z do sarcômero (seta); retículo sarcoplasmático (cabeça de seta) em **B**. **C e D:** Grupo VBBj. Observar fibras musculares em regeneração (1,2 e 3) com áreas sem miofilamentos (*), núcleos com cromatina frouxa (Nu) localizados na periferia em **C** e em posição mais interna na fibra em **D**. Fibra muscular diferenciada (Fi); **E e F:** Grupo VBBj + EACs. Em **E**, área do músculo em regeneração com fibra muscular apresentando núcleo interno, com cromatina frouxa (Nu). Endomísio espesso com tecido conjuntivo (En). Em **F**, região do músculo com aumento de colágeno em área de regeneração. Fibras colágenas (FC). Núcleo de fibroblasto (Fb).

4. Microscopia Confocal do Músculo Tibial Anterior

As imagens dos receptores de acetilcolina na placa motora, sob microscopia confocal, encontram-se ilustradas nas figuras 11, 12 e 13. A análise destas imagens nos grupos experimentais revelou discreta dispersão dos receptores de acetilcolina nos grupos veneno 24 horas e 7 dias (Figs. 11 e 12). Nos grupos EACs o padrão foi muito semelhante morfológicamente ao controle (Figs. 11, 12, 13). Já nos grupos que receberam veneno + extrato observou-se manutenção do padrão morfológico com ausência da dispersão descrita acima (Figs. 11, 12, 13). Chama atenção a morfologia de distribuição dos receptores observada no grupo veneno 21 dias, onde foi observada uma tendência de organização dos receptores de acetilcolina no padrão de ilhas, formando uma série de arborizações caracterizadas por áreas fluorescentes descontínuas, a qual foi mais evidente neste grupo (Fig. 13).

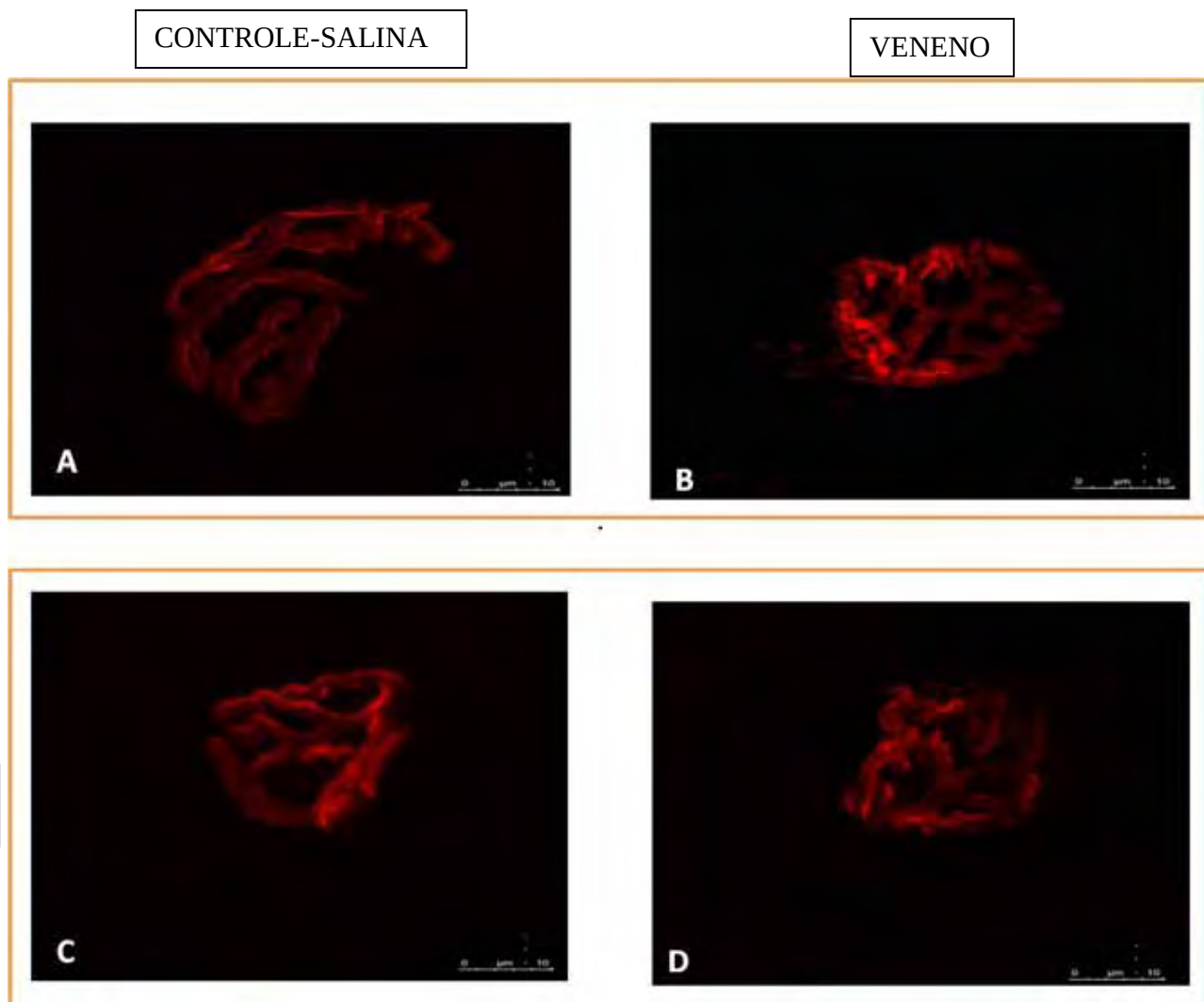


Figura 11. Visão geral através de microscopia confocal a laser da placa motora do músculo tibial anterior com receptores de acetilcolina marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina, após 24 horas da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2 μ g/g i.m.). (A) Músculo controle, grupo salina 24 horas. (B) Grupo veneno 24 horas. (C) Grupo salina + EACs 24 horas. (D) Grupo veneno + EACs 24 horas. (aumento 40x).

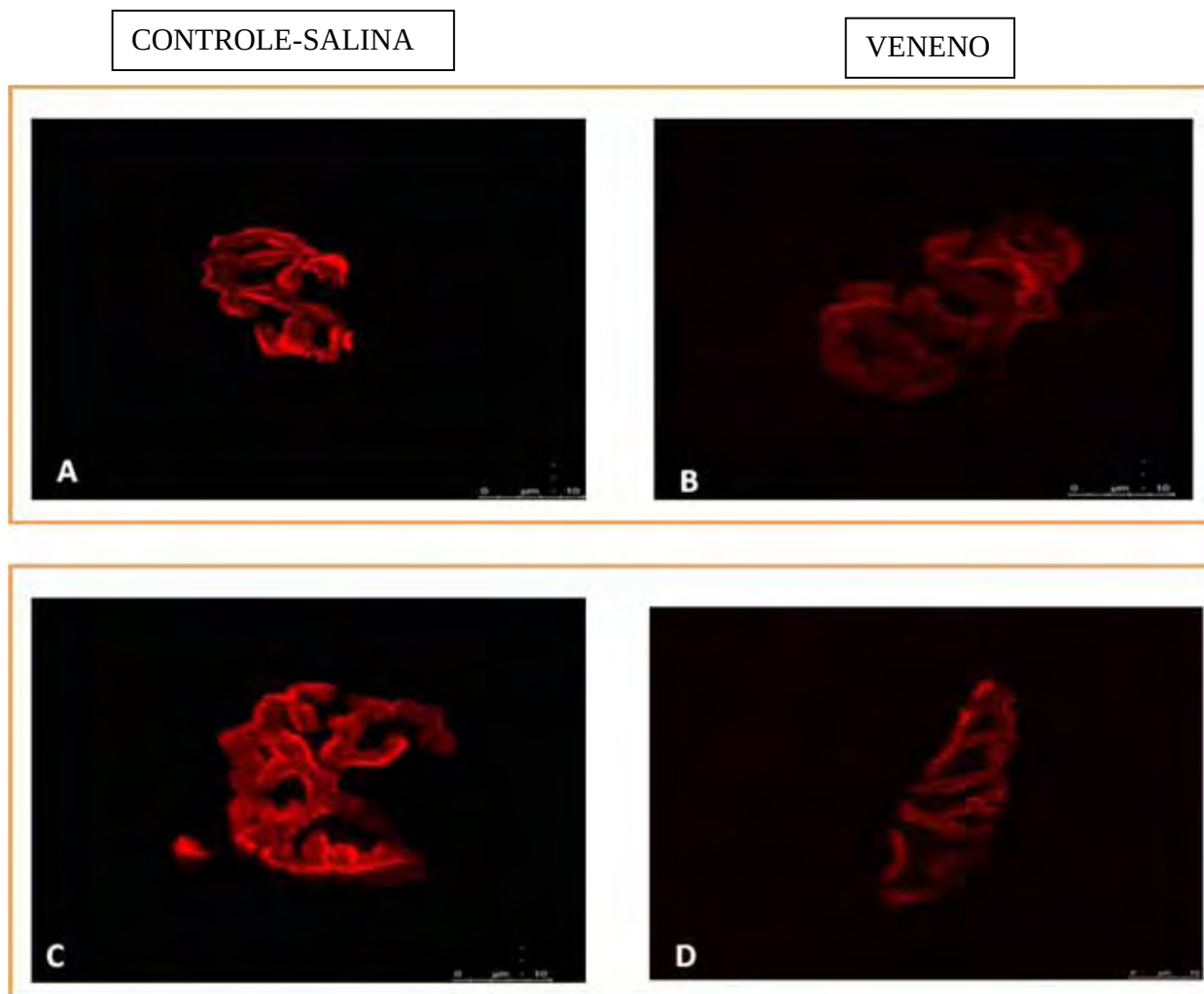


Figura 12. Visão geral através de microscopia confocal a laser da placa motora do músculo tibial anterior com receptores de acetilcolina marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina, após 7 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle, grupo salina 7 dias. (B) Grupo veneno 7 dias. (C) Grupo salina + EACs 7 dias. (D) Grupo veneno + EACs 7 dias. (aumento 40x).

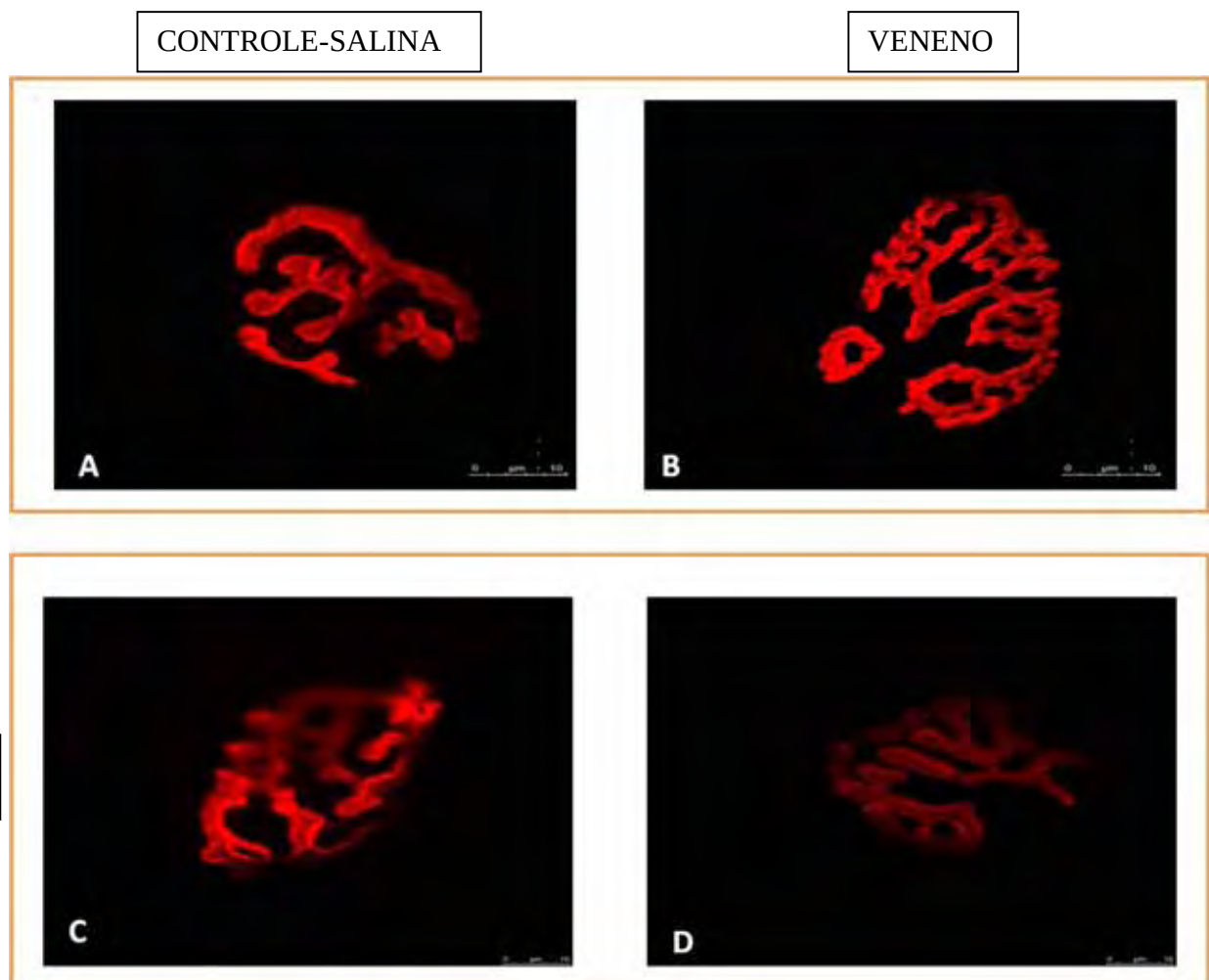
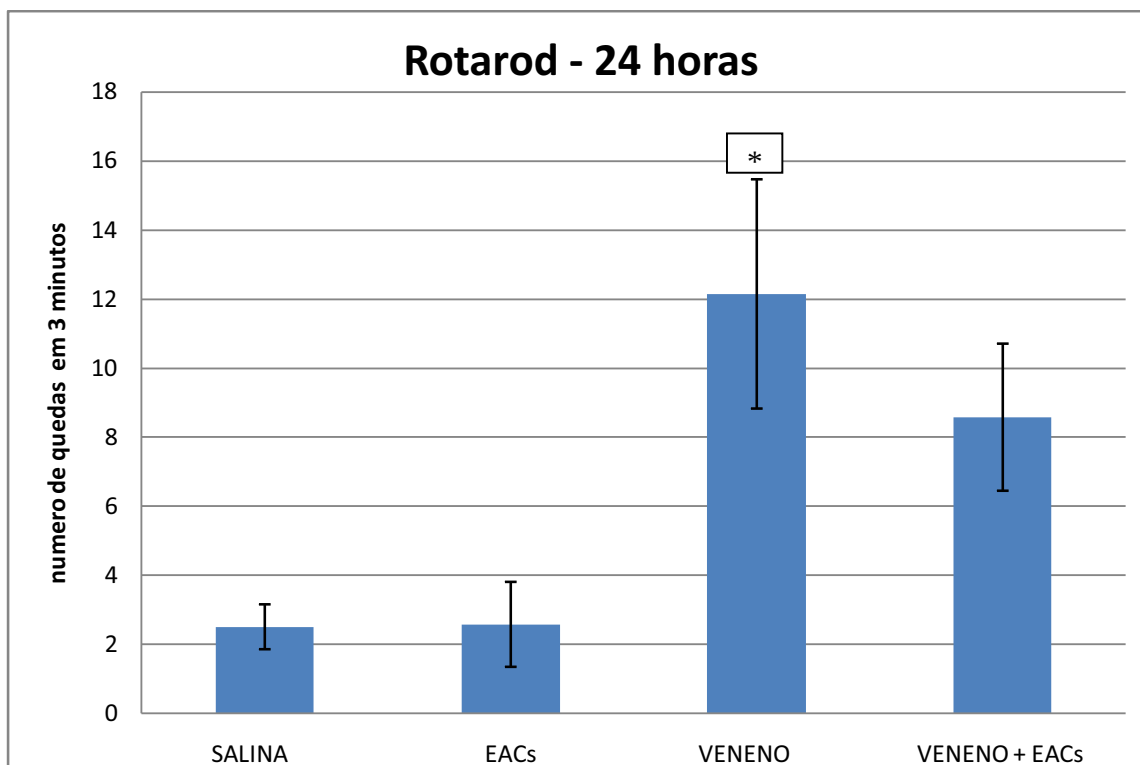
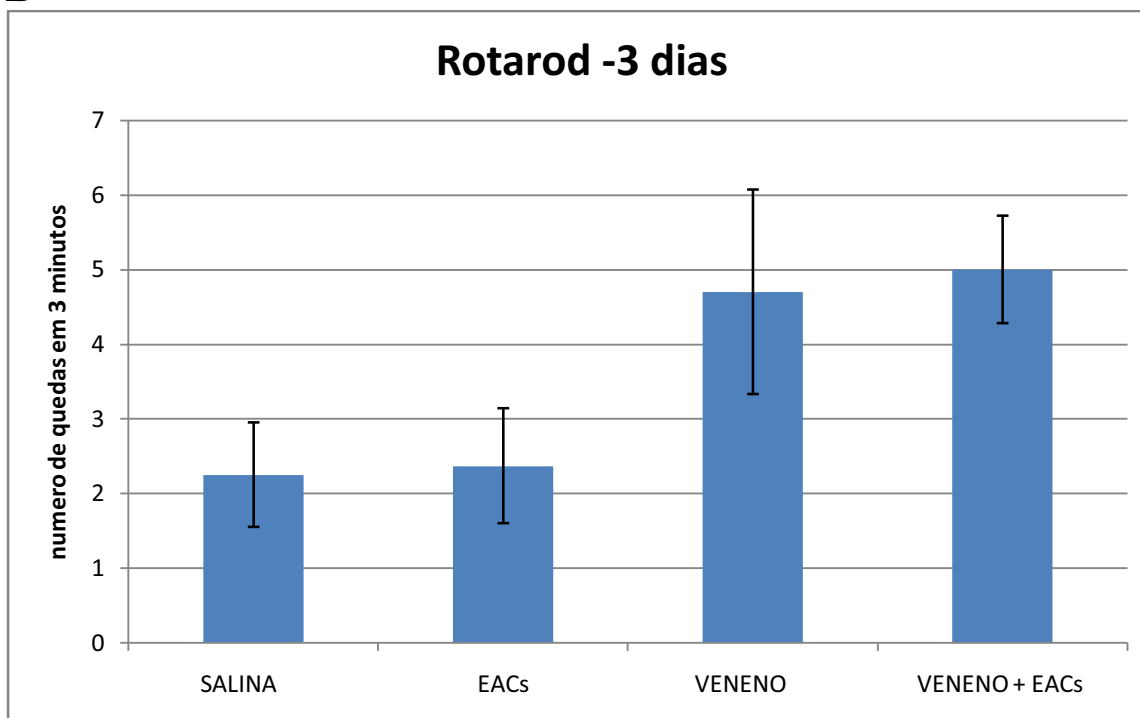


Figura 13. Visão geral através de microscopia confocal a laser da placa motora do músculo tibial anterior com receptores de acetilcolina marcados com alfa-bungarotoxina associado à rodamina, após 21 dias da administração de dose única de veneno bruto da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.). (A) Músculo controle, grupo salina 21 dias. (B) Grupo veneno 21 dias. (C) Grupo salina + EACs 21 dias. (D) Grupo veneno + EACs 21 dias. (aumento 40x).

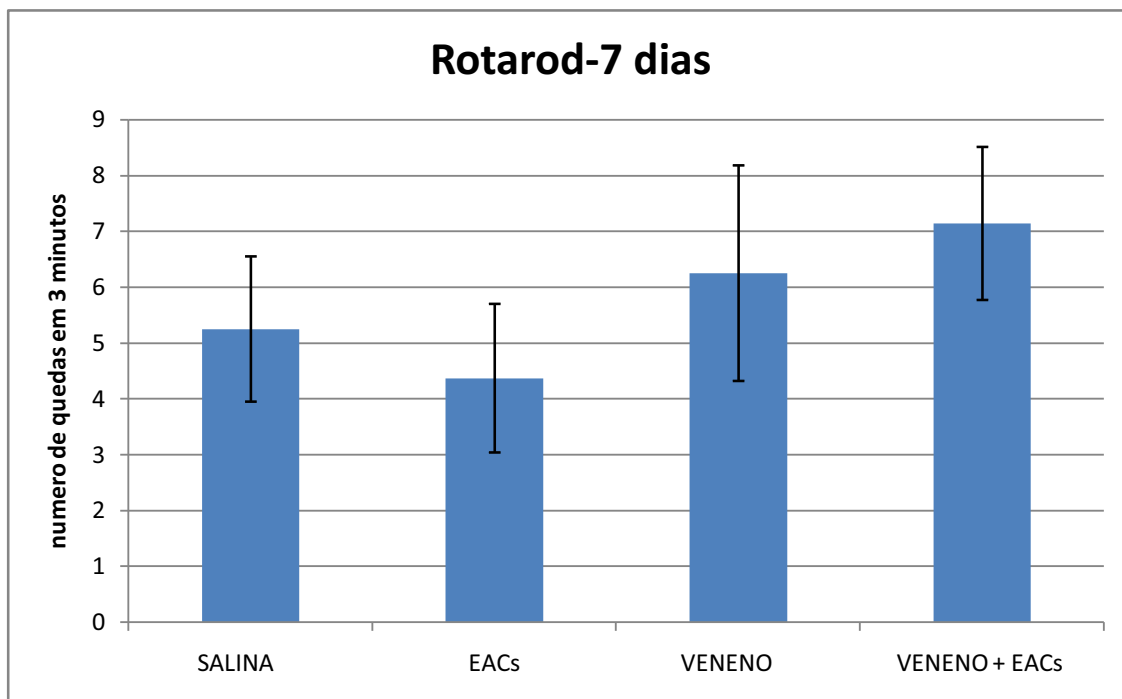
4. Teste da Barra Giratória – Avaliação da Atividade Motora *in vivo*

Os gráficos do teste da barra giratória encontram-se ilustrados nas figuras (14 A, B, C e D). O número de quedas dos animais foi significativamente maior após 24 horas da administração do veneno, quando comparado aos grupos controle e EACs (Fig. 14A). Neste mesmo período, o número de quedas do grupo veneno + EACs não foi significativamente diferente do grupo veneno (Fig. 14A).

As mesmas avaliações foram realizadas após 3, 7 e 21 dias, todavia não se verificou diferença significativa do grupo veneno em relação aos grupos salina e EACs (Figs. 14B, 14C e 14D).

A**B**

C



D

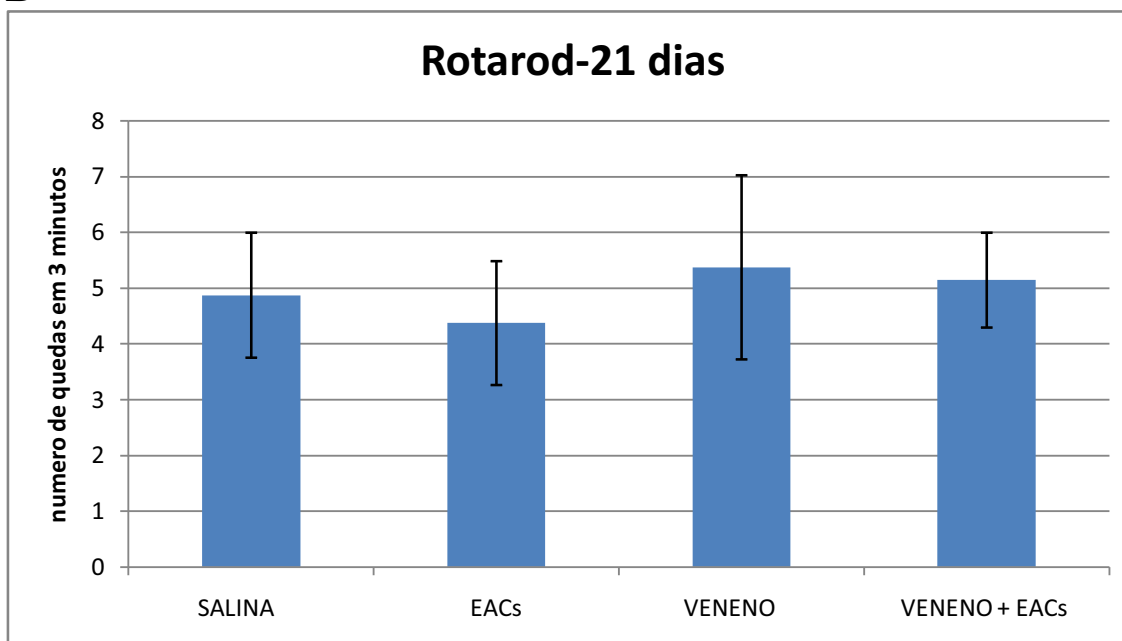


FIGURA 14. Efeito da aplicação tópica do extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (1:5 veneno/EACs, 1 vez ao dia/21 dias) sobre o número de quedas dos camundongos no aparelho Rotarod, após 24 horas (A), 3 (B), 7 (C) e 21 dias (D) da mionecrose induzida por veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (2µg/g). N de 8 por grupo.* indica diferença significativa do grupo veneno em relação a salina e EACs, após 24 horas (A). ($P < 0.05$). As barras mostram epm.

DISCUSSÃO

A soroterapia passiva consiste no único recurso terapêutico de eficácia comprovada para os envenenamentos causados por mordeduras de serpentes peçonhentas. No entanto, apesar de neutralizarem efetivamente as alterações sistêmicas provocadas pelos venenos, os soros conferem limitada proteção contra os danos teciduais locais, particularmente contra aqueles promovidos pelos venenos botrópicos (Lomonte *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2011). Como consequência, nesses envenenamentos, pode se estabelecer um quadro grave de mionecrose, evoluindo para perda tecidual permanente e desabilitação da vítima. Sendo assim, a busca por terapias complementares na neutralização dos danos teciduais locais ocasionados pelos venenos ofídicos é de grande importância para a saúde pública. Neste sentido, as plantas utilizadas na medicina popular como antiofídicas surgem como alternativas promissoras que, todavia, carecem de estudos farmacológicos para a comprovação de suas atividades (Soares *et al.*, 2004). Desta forma no presente estudo investigou-se a eficácia do extrato aquoso bruto da *Casearia sylvestris* na neutralização dos efeitos tóxicos locais promovidos pelo veneno da *Bothrops jararacussu*.

Os resultados deste estudo mostraram, inicialmente, que a mionecrose e a subsequente regeneração do músculo tibial anterior de camundongos, observadas após envenenamento experimental, induzido pelo veneno da *Bothrops jararacussu* (2µg/g i.m.), apresentaram aspecto e decurso temporal semelhantes aos já descritos para outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Gutiérrez, 2002; Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003). A observação geral do músculo *in situ* e a análise histológica do músculo revelaram a rápida instalação das lesões teciduais, que já foram evidentes após 24 horas da

administração do veneno, sendo caracterizadas por edema, hemorragia, infiltrado inflamatório e presença de fibras musculares desorganizadas e anucleadas. Após o terceiro dia do envenenamento constatou-se redução deste processo inflamatório e, a partir do sétimo dia, o processo de regeneração tornou-se evidente, evoluindo assim até vigésimo primeiro dia. Todavia, a análise morfométrica revelou que após 14 e 21 dias da administração do veneno, as fibras musculares ainda apresentavam áreas menores em relação ao controle. Desta forma, pode-se sugerir que, após 21 dias do envenenamento, o processo de regeneração muscular ainda não estava completo, ou que o músculo apresentava fibras atroficas. Este fato pode estar relacionado à perda de tecido muscular, uma consequência freqüente nos envenenamentos botrópicos (Warrell, 2004).

A patogênese da mionecrose induzida pelos venenos botrópicos é complexa e envolve principalmente a ação de PLA₂s miotóxicas e metaproteinases hemorrágicas, embora outros componentes dos venenos como hialuronidases e metaloproteinases não-hemorrágicas possam também contribuir para o processo (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Gutiérrez & Ownby, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Na mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* apresenta particular importância uma Lys49 PLA₂ miotóxica denominada bothropstoxina-I (BthTX-I), que representa cerca de 15% do peso seco do veneno (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988). Embora o mecanismo de ação desta miotoxina não esteja totalmente esclarecido, evidências experimentais sugerem que a bothropstoxina se liga, através de interação eletrostática, a um domínio aniônico da membrana celular da fibra muscular esquelética. Após esta ligação inicial, a

miotoxina penetra na bicamada lipídica, através de interação hidrofóbica mediada por uma região citotóxica da molécula, promovendo desestabilização e conseqüente impedimento na regulação da permeabilidade da membrana a íons e macromoléculas. Um influxo de cálcio é, provavelmente, a conseqüência mais relevante do distúrbio de membrana, iniciando uma série de mecanismos degenerativos como, alterações citoesqueléticas, danos mitocondriais, e ativação de proteases e fosfolipases cálcio-dependentes, que ampliam os danos celulares (Lomonte *et al.*, 2003; Gallacci & Cavalcante, 2010; Lomonte & Rangel, 2012).

As metaloproteinases desempenham papel chave no estabelecimento da mionecrose e na limitada regeneração muscular, observada após os envenenamentos botrópicos, através de uma somatória de ações sobre membrana basal de músculos, vasos sanguíneos e nervos (Gutiérrez & Ownby; 2003; Hernández *et. al.*, 2011).

Deve-se ressaltar que, em circunstâncias normais, o músculo esquelético de mamíferos adultos é um tecido estável com pouca renovação nuclear. No entanto, após sofrer injúria, o músculo apresenta notável capacidade de regeneração visando prevenir a perda de massa muscular (Chargé & Rudnicki, 2004).

A regeneração muscular é um processo altamente sincronizado que envolve a interação entre células miogênicas, células inflamatórias, vasos sanguíneos, nervos e matriz extracelular (Ciciliot & Schiaffino, 2010). A regeneração inicia-se após a lesão das fibras musculares, com a ativação de uma população de células miogênicas quiescentes (células satélites), localizadas na periferia das fibras musculares entre o sarcolema e a membrana basal (Hawke &

Garry, 2001; Ciciliot & Schiaffino, 2010). Uma vez ativadas, as células satélites tornam-se mioblastos que, após vários ciclos de replicação, sofrem fusão celular formando miotubos multinucleados, que então dão origem miofibras adultas. Para que este processo ocorra com sucesso, são necessárias condições adequadas no microambiente onde a regeneração se estabelecerá. Assim, após lesão da fibra muscular, segue-se uma reação inflamatória, com a invasão do tecido por neutrófilos e macrófagos. Estas células removem o tecido necrótico e sintetizam várias citocinas e fatores de crescimento que modulam a regeneração dos tecidos e a sobrevivência dos mioblastos (Tidball, 2008).

A presença de uma membrana basal intacta em torno dos músculos necróticos é importante para a demarcação do espaço onde os mioblastos se replicarão para formarem células musculares maduras (Vracko & Benditt, 1972; Ciciliot & Schiaffino, 2010). Quando mioblastos em proliferação não são confinados ao espaço delimitado pela membrana basal, eles podem proliferar fora deste espaço. Nessas condições, menos células passariam por fusão e, conseqüentemente são gerados miotubos de pequeno calibre (Ciciliot & Schiaffino, 2010). Tal hipótese deve ser considerada para explicar a presença de fibras musculares atroficas em músculos submetidos a ação do veneno da *Bothrops jararacussu*, uma vez que, as metaloproteinases presentes em venenos botrópicos promovem a hidrólise de componentes da membrana basal de músculos (Escalante *et al.* , 2006; Hernández *et al.* 2011).

O processo regenerativo também é prejudicado quando ocorre lesão da membrana basal dos vasos sangüíneos pelas enzimas metaloproteinases. Uma consequência importante desta lesão nos vasos é a isquemia, que pode levar à

redução no fornecimento de oxigênio e nutrientes, que são requisitos essenciais para o processo regenerativo dos tecidos (Harris, 2003; Ciciliot & Schiaffino, 2010). Isto pode levar, em algumas áreas, à substituição de tecido muscular por fibrose e a presença de fibras de diâmetro reduzido (Gutiérrez *et. al.*, 1984; Salvini *et. al.*, 2001).

O crescimento de uma fibra muscular em regeneração também é dependente de uma inervação funcional, pois as terminações nervosas liberam vários fatores de crescimento que são essenciais para a maturação da fibra muscular (Harris, 2003). De fato, evidências experimentais revelam a presença de fibras atroficas em músculos regenerados que apresentam comprometimento na inervação (Hernández *et al.*, 2011). No envenenamento botrópico, o dano axonal pode se estabelecer como consequência da isquemia resultante da lesão microvascular ou da lesão da membrana basal dos nervos, que são induzidas pelas metaloproteinases presentes nestes venenos (Slater & Schiaffino, 2008). Estas lesões na membrana basal podem afetar vários componentes, como o proteoglicano, que desempenha um papel chave no crescimento axonal e na formação de junções neuromusculares (Slater & Schiaffino, 2008). Portanto, uma microvasculatura intacta (Ciciliot & Schiaffino, 2010), em conjunto com uma boa restauração da junção neuromuscular são requisitos necessários para que a regeneração muscular ocorra (Slater & Schiaffino, 2008).

Assim, pode-se supor que a presença de fibras atroficas de diâmetro pequeno, em tecido injetados com veneno botrópico, pode ser consequência dos danos ocasionados pelas metaloproteinases à membrana basal dos músculos, vasos sanguíneos e nervos (Hernández *et. al.*, 2011).

Outro aspecto característico de músculos em regeneração é a presença de fibras musculares imaturas com a presença dos receptores de acetilcolina fora da região da placa motora (Harris, 2003). A agregação dos AchRs na placa motora é efetuada pela agrina, uma proteína produzida em músculos e nervos, sendo a isoforma neuronal envolvida no agrupamento destes receptores na região juncional. A agrina é liberada da terminação nervosa e incorporada à lâmina basal da fibra muscular na região da JNM (Bowe & Fallon, 1995). As imagens obtidas por microscopia confocal, no presente estudo, são indicativas da dispersão dos receptores de acetilcolina na região da placa motora dos músculos após 21 dias do envenenamento experimental. Desta forma, pode-se sugerir que a dispersão destes receptores seja também consequência dos danos ocasionados pelas metaloproteinases do veneno na membrana basal dos nervos e dos músculos.

Uma das principais sequelas que se seguem à mionecrose induzida pelo envenenamento botrópico é a perda permanente de massa muscular, que pode desabilitar o acidentado em função do comprometimento da atividade locomotora (Gutiérrez & Lomonte, 1989 e 1995; Otero *et al.*, 2002). Todavia, os resultados do presente estudo mostraram que os animais apresentaram comprometimento da atividade locomotora, avaliada através do teste da barra giratória, apenas após 24 horas do envenenamento experimental. Tais resultados possivelmente são consequência da dor decorrente do processo inflamatório agudo, induzido pelo veneno, e não, da perda da massa muscular, uma vez que a partir do terceiro dia do envenenamento, não se constatou comprometimento da atividade locomotora. Resultados similares foram descritos por Saturnino-Oliveira e cols (2012) utilizando o mesmo veneno e a mesma metodologia experimental.

Observou-se ainda neste estudo que a administração tópica do extrato aquoso da *Casearia sylvestris* reduz os efeitos tóxicos locais característicos do envenenamento experimental induzido pelo veneno da *Bothrops jararacussu*. Esta redução já foi evidente 24 horas após o envenenamento e se manteve ao longo dos 21 dias, como constatado pela observação macroscópica e pela análise histológica, que revelaram músculos com aspecto mais conservado no grupo que recebeu o tratamento, o que sugere a neutralização do veneno pelo extrato. Esta hipótese é corroborada pelos resultados da análise morfométrica que mostrou a presença de fibras com áreas maiores no grupo veneno+EACs quando comparado ao grupo veneno, possivelmente indicando a redução do dano inicial promovido pelo veneno, em função de sua parcial neutralização pelo extrato. As imagens obtidas através da microscopia confocal também confirmam esta hipótese ao revelarem regiões de placa motora das fibras musculares com aspecto maduro. Os resultados do estudo funcional também sugerem a parcial neutralização do veneno pelo extrato visto que, após 24 horas, já não se observou comprometimento da atividade locomotora no grupo veneno + EACs em relação ao grupo controle. Deve-se ressaltar que o EACs sozinho não induziu nenhuma toxicidade no músculo estudado, pois este se manteve com um aspecto normal similar ao controle.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com achados de Borges e cols (2000 e 2001) que verificaram inibição das atividades edematogênica, miotóxica e hemorrágica de venenos de várias espécies de *Bothrops* após a pré-incubação com o extrato de *Casearia sylvestris*. Um possível mecanismo de ação proteolítico do extrato vegetal foi afastado por estes autores, uma vez que os

padrões eletroforéticos dos venenos foram mantidos após a pré-incubação com o extrato.

A *Casearia sylvestris* possui diversos componentes que podem estar envolvidos na atividade antiofídica e na neutralização dos danos locais induzidos pelos venenos botrópicos. Embora os componentes desta planta ainda não estejam totalmente caracterizados, foram identificadas frações contendo taninos, flavonóides, cumarinas, lignanas e diversos diterpenos (Borges *et al.* 2001; Lorenzi & Matos, 2002). Os flavonóides apresentam um amplo espectro de atividades, anti-inflamatória, antioxidante e quelante de cátions divalentes, entre outras (Alcaràz & Hoult, 1985; Middleton JR & Kandaswami, 1992; Borges *et al.*, 2001; Wilhelm filho *et al.*, 2001). Os cátions divalentes fazem parte dos componentes não protéicos dos venenos botrópicos, e atuam como co-fatores para diferentes atividades enzimáticas destes venenos, além de serem constitutivos nas metaloproteinases (Delfino & Canniatti-Brazaca, 2010). Deste modo, a atividade quelante dos componentes presentes na planta *Casearia sylvestris* pode ter contribuído para a neutralização do efeito miotóxico do veneno da *Bothrops jararacussu* por inativar metaloproteinases, PLA2s e outras enzimas envolvidas na gênese do dano muscular. Em adição deve-se ressaltar que os flavonóides possuem alta reatividade química, podendo se ligar e inibir várias enzimas (Havsteen, 1983). Todavia, uma vez que no presente estudo foi utilizado o extrato bruto da planta, não se pode excluir a possibilidade de que o efeito antiofídico observado resulte do sinergismo de seus vários componentes.

Um outro aspecto, observado no decorrer do presente trabalho, foi a intensa proliferação de fibroblastos e a presença de colágeno entre as fibras

musculares dos animais submetidos ao envenenamento após a aplicação tópica do EACs. Este efeito foi mais evidente após a aplicação crônica do extrato (ao longo dos 21 dias) do que após a aguda (apenas no primeiro dia). Um aumento das fibras de colágeno também foi observado por Sertié e cols (2000) na mucosa estomacal, após 5 dias de tratamento com o extrato aquoso bruto de *Casearia sylvestris*, em modelo de indução de ulcera crônica. Estes resultados podem estar relacionados às propriedades cicatrizantes e antiinflamatórias já descritas na literatura para *Casearia sylvestris* (Sertié *et al.*, 2000; Raslan *et al.*, 2002). Em lesões musculares, o uso de substâncias antiinflamatórias pode provocar um aumento de fibras de colágeno e diminuição da quantidade de fibras musculares, alterando as propriedades biomecânicas do músculo (Medrado *et al.*, 2003). Todavia, nas condições experimentais deste trabalho, não foram observadas alterações da atividade locomotora dos animais submetidos ao envenenamento experimental e tratados com o extrato.

Tomados em conjunto os resultados deste estudo mostraram que o extrato aquoso da *Casearia sylvestris* protegeu, inicialmente, as fibras musculares do efeito miotóxico do veneno e posteriormente estimulou o processo de cicatrização.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a aplicação tópica do extrato aquoso de *Casearia sylvestris*:

1. Neutraliza parcialmente as lesões na musculatura esquelética induzidas pelo veneno da *Bothrops jararacussu*.
2. Não afeta o processo de regeneração muscular que se segue ao envenenamento.
3. Estimula a produção de fibroblastos e de colágeno entre as fibras musculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCARÁZ M. J.; HOULT, J.R.S.- Actions of flavonoids and the novel anti-inflammatory flavone hipolactin- 8- glucoside on prostaglandin biosynthesis inactivation. **Biochem. Pharmacol.**, v.34, n.12, p. 2477-2482, 1985.

AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-85, 1985.

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract from *Casearia sylvestris*. **Journal of Ethnopharmacology** v.30, p.185–187, 1990.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snakes venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 7, p. 121-209, 1988.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO J. A. A. R.; CRUZ-HÖFLING M. A. Histological and physiological alterations in the kidneys of rats induced by *Bothrops moojeni* venom. **Braz J Morphol Sci.** v.14, p.173, 1997.

BORGES, M. H., A. M.; SOARES, V. M.; RODRIGUES, S.H.; ADRIÃO-ESCARSO, H.; DINIZ, A.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, S.; LIZANO, J. M.; GUTIÉRREZ, J. R.; GIGLIO M. I.; HOMSI-BRANDEBURGO. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comp. Biochem. Physiol.** Part B 127:21-30, 2000.

BORGES, M. H. A. M.; SOARES, V. M.; RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, A. M.; FRANSCHESCHI, A.; RUCAVADO, J. R.; GIGLIO M. I.; HOMSI-BRANDEBURGO. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venom by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** 39:1863-1869, 2001.

BOWE, M.A.; FALLON, J.R. The role of agrin in synapse formation. **Ann. Rev. Neurosci.** 18, 443–462, 1995.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Ofidismo: Análise epidemiológica. Brasília, D.F., p.1-49, 1991.

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

BRAZIL V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. II - Veneno de algumas espécies brasileiras. **Rev Med São Paulo**. 4: 296. 1901 a.

BRAZIL V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. III - Tratamento de mordeduras das cobras. **Rev Med São Paulo**. 4: 375. 1901b.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v.50, p.S237-S242, 2009.

CALMETTE, A. Les Venis: Les animaux venimeux et la sérothérapie antivenimeuse. **Paris: Masson et Cie**, 396p. 1907.

CALVETE, J.J.; BORGES A.; SEGURA, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; DIEZ N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J.G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J Proteomics**. Mar 6;72(2):227-40, 2009.

CARDOSO, J.L.C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica. São Paulo: **Sarvier**, 2003.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. O.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490 – 497, 2007.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S.; Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Curr Pharm Des** 16: 906–914, 2010.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antithrombotic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytother Res**. Jun; 22(6):784-90, 2008.

CHARGÈ, S.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev**; 84: 209–238, 2004.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA(2) activity. **Toxicon**. Nov; 52(6):655-66. Epub Aug 5, 2008.

DE OLIVEIRA, R.C.; WEN, F.H.; SIFUENTES, D.N. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, S.F.O; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR,V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier. p.6-21, 2009.

DELFINO, R.A. & CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Cienc Tecnol Aliment**. 30: 308–312, 2010.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E., DEULOFEN, V. (Eds.) *Venomous animals and their venoms*. New York: **Academic Press**, 1968.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. *A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice*. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc** (Baltim). Mar; 46(3):208-9, 1957.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. **Arch Biochem Biophys** 455: 144–153, 2006.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, S.F.O.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos**. São Paulo: Sarvier, p.81-95, 2009.

GALLACCI, M. and CAVALCANTE, W.L.G. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon**, v.55, p.1–11, 2010.

GASPERSIC, K.; KORITNIK, B.; ERZEN, I.; SKETELJ, Y. Muscle activity-resistant acetylcholine receptor accumulation is induced in places of former motor endplates in ectopically innervated regenerating muscle. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 339–346, 2001.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, v. 52, p. 211-23, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33: 1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. v.82, n.9-10, p.841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 Years of research in Latin America. *Rev. Biol. Trop.*, v.50, n.2, p.377–394, 2002.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.*, v.3, n.6, p.150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*, v.39, n.3 p.129-42, 2011.

HACK, C., LONGHI, S.J., BOLIGON, A.A., MURARI, A.B., PAULESKI, D.T. Análise fitossociológica de um fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. **Ciência Rural** 35, 1083–1091, 2005.

HARRIS, J.B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon** 42: 933–945, 2003.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology** 32 (7), 1141-1148, 1983.

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

HERNÁNDEZ, R.; CABALCETA, C.; SARAIVA-OTTEN, P.; CHAVES, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Poor Regenerative Outcome after Skeletal Muscle Necrosis Induced by *Bothrops asper* Venom: Alterations in Microvasculature and Nerves. **PLoS One**. 2011;6(5):e19834. Epub 2011 May 24. Erratum in: PLoS One. 2011;6(7).doi:10.1371/annotation/9caa2be8-b5e6-4553-8575-f0b575442172,2011.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**. 26: 615-627, 1988.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; LITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chem Pharm Bull** (Tokyo) 38(12):3384-8, 1990.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms In: LEE, C. Y., (Ed.) Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: **Springer-Verlag**. chap. 52, p. 61-158, 1979.

JANSEN, J.K.S.; FLADBY, T. The perinatal reorganisation of the innervation of skeletal muscle in mammals. **Prog. Neurobiol.** 34, 39–90, 1990.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.278, n.2, p.319-325, 1990.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, v.5, n.11, p.e218, 2008.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon.** 42(8): 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A(2) to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon.** Sep 15;60(4):520-30. Epub 2012 Mar 3, 2012.

MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipases A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon.** 24: 1001-8, 1986.

MEDRADO, A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med**; 32:239-244, 2003.

MELO, P.A.; OWNBY, C.L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. **Toxicon**. Jan;37(1):199-215, 1999.

MIDDLETON, Jr. M. J.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n.6, p. 1167-1179, 1992.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; RODRÍGUEZ, L.M.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; GÓMEZ, L.M.; URIBE, F.L.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1107-1114, 2002.

OTERO, L.; ZURITA, M.; BONILLA, C.; AGUAYO, C.; RICO, M.A.; VAQUERO, J. Perspectives of cell therapy in sequelae from cerebrovascular accidents. **Neurocirugia** (Astur). Aug 1, 2012.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p.441-5, 1999.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw.” **Boll. Chim. Farm** 141(6): 457-60, 2002.

REIST, N.E.; WERLE, M.J.; MCMAHAN, V.J. Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. **Neuron**. 8, 865–868, 1992.

ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Marcel Dekker, 1990.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E.; DEULOFEN, V.; editors. **Venomous animals and their venoms**. New York: **Academic Press**.v.2, 1971.

SALVINI, T.F.; BELLUZZO, S.S.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H. Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Toxicon** 39: 641–649, 2001.

SATURNINO-OLIVEIRA, J.; TOMAZ, M. A.; FONSECA, T.F.; GABAN, G.A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; STRAUCH, M.A.; CONS, B. L.; CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P.A. Pulsed ultrasound therapy accelerates the recovery of skeletal muscle damage induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Braz J Med Biol Res**. 2012 Jun;45(6):488-96, 2012.

SERTIÉ, J.A.; CARVALHO, J.C.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *casearia sylvestris*. **Pharm Biol**. 38 (2):112-9, 2000.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/> Acessado em: Julho de 2009.

SLATER, C.R. Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. **Dev. Biol**. 94, 11–22, 1982.

SLATER, C.R.; SCHIAFFINO, S. Innervation of regenerating muscle. In: Schiaffino S, Partridge T, eds. **Skeletal Muscle Repair and Regeneration Springer**. pp 303-333, 2008.

SOARES, A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, v. 29, p. 1105-1117, 2004.

TIDBALL, J.G. Inflammation in skeletal muscle regeneration. In: SCHIAFFINO, S.; PARTRIDGE, T. eds. **Skeletal Muscle Repair and Regeneration Springer**. pp 243-268, 2008.

VRACKO, R.; BENDITT, E.P. Basal lamina: the scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured muscle fibers and capillaries. **J Cell Biol** 55: 406–419, 1972.

VAN DEENEN, L.L.M.; DE HAAS, G.H. The substrate specificity of phospholipase A2. **Biochim. Biophys. Acta**, v.70, p.538-553, 1963.

WARRELL D.A. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. In: CAMPBELL, J.A.; LAMAR W.W. eds. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, vol I. Ithaca and London: **Cornell University Press**. pp 709–761, 2004.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides, antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: Importância e perspectiva terapêutica. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (orgs). - Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: **Argos editora universitária**. p. 317-334, 2001.

WHO, 2011. **Snakebite**. Genebra, World Health Organization (WHO), Neglected Diseases, Diseases covered by NTD Department. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html

http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/.../Quadro%20da%20Miniatura.htm

<http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/guacatonga.html>