

EFEITO DA NANDROLONA SOBRE A REGENERAÇÃO DA MIONECROSE INDUZIDA PELO VENENO DA *Bothrops jararacussu*: ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL.

William Gonçalves, Maeli Dal Pai Silva, Márcia Gallacci, Rodrigo Wagner Alves de Souza. – Morfologia – Ciências Biológicas – Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências - Unesp Botucatu.

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos registrados no país (FUNASA, 2001). Os venenos botrópicos são misturas complexas de proteínas e peptídeos biologicamente ativos (DEVI, 1968; BJARNASON & FOX, 1994).

Os acidentes botrópicos caracterizam-se por sintomas locais e sistêmicos, que incluem dor, edema, hemorragias, mionecrose e distúrbios da coagulação sanguínea (ROSENFELD, 1971). A mionecrose promovida por esses venenos é um efeito tóxico local severo, que pode levar à perda tecidual permanente e à amputação, desabilitando o acidentado (GUTIERREZ & LOMONTE, 1989 e 1995, MILANI et al., 1997; JORGE et al., 1999). Embora a soroterapia seja eficaz no combate aos efeitos sistêmicos do envenenamento botrópico, pouco contribui para a melhoria da mionecrose local (GUTIERREZ & LOMONTE, 1989).

A patogênese da necrose muscular induzida pelos venenos botrópicos não está totalmente elucidada. Todavia, sugere-se que esta possa decorrer indiretamente da isquemia do tecido muscular, induzida por fatores hemorrágicos presentes nestes venenos, ou diretamente da ação de miotoxinas que apresentam especificidade pelo tecido muscular (MEBS & OWNBY, 1990; OWNBY, 1990; SANTOS et al., 1992). As miotoxinas são proteínas estruturalmente semelhantes às enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂), sendo referidas como PLA₂ miotóxicas (MEBS, 1986; GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

Quando injetado em camundongos, o veneno da *Bothrops jararacussu* induz lesões locais das fibras musculares com liberação de creatina quinase (CK) para o soro (MEBS et al, 1983; QUEIROZ et al, 1984; SANTOS et al, 1992). A extensão da regeneração é altamente dependente da dose de veneno injetada, observando-se fibrose e impedimento da resposta regenerativa quando doses de 20 µg ou maiores foram injetadas (QUEIROZ et al., 1984).

Inúmeras evidências indicam o envolvimento das células satélites no processo de regeneração muscular (MALTIN et al., 1983; ARCE et al., 1991), as quais permanecem viáveis após a injúria induzida por venenos ofídicos. As células satélites são mioblastos que não se fundem durante a miogênese e permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal (MAURO, 1961; FRANZINI-ARMSTRONG, 1979; MAZANET et al., 1982).

Apesar da aparente posição estática na fibra muscular, as células satélites são dotadas de certa motilidade, sendo capazes de atravessar a lâmina basal e migrar para fibras próximas ou até deslocar-se em direção ao músculo adjacente, em casos de lesões mais severas (HUGHES & BLAU, 1990; GUERIN & HOLLAND, 1995). As células satélites são encontradas em maior proporção na região da junção mio-neural, na região músculo-tendínea e próximo a capilares (BISCHOFF, 1994).

As células satélites podem ser recrutadas em várias circunstâncias: durante o crescimento, após desnervação e lesão muscular induzida por diversos agentes (APPELL et al., 1988; GROUNDS & YABLONKA-REUVENI, 1993). Quando ativadas, essas células proliferam os núcleos podem ser adicionados à fibra pré -existente, podendo formar uma nova fibra ou ainda reparar parte da fibra lesada.

O processo de regeneração envolve a remoção de “debris” celulares na área lesada, mediada pelas células inflamatórias, que ativam a proliferação e a diferenciação das células satélites (VIERCK et al., 2000), sob a ação dos fatores reguladores miogênicos, MyoD, Myf5, miogenina e

MRF4 (CHARGÉ & RUDINICKI, 2004). Alguns eventos que ocorrem durante o processo de regeneração das fibras musculares são semelhantes aos que ocorrem durante o desenvolvimento dos músculos esqueléticos (CAMPION, 1984). O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos morfológicos da regeneração da mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu*.

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, jovens, com peso entre 20 a 25 g, agrupados em: controles e submetidos à inoculação com veneno da *Bothrops jararacussu* liofilizado, e mantidos sob temperatura controlada (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12:12 h), com água e alimento *ad libitum*.

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e a mionecrose foi induzida pela administração do veneno da *Bothrops jararacussu* (30 µg/50 µl de solução salina fisiológica) abaixo do músculo extensor longo dos dedos (EDL) do membro direito (Melo & Ownby, 1999) causando a mionecrose no músculo EDL.

A morfologia do músculo foi avaliada após 24 h, 3, 7, 14 e 21 dias da administração do veneno.

Em cada período estudado, o músculo EDL foi isolado e submetido a tratamento criobiológico. Cortes histológicos com 9 µm de espessura, obtidos em micrótomo criostato a -20°C foram submetidos à coloração HE (DUBOWITZ, 1985), para a avaliação da morfologia geral do músculo. Cortes histológicos do músculo EDL também foram submetidos à reação de imunofluorescência para MyoD para avaliar o grau de proliferação celular (proliferação das células satélites) no músculo em regeneração.

A análise das lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina-Eosina mostrou o músculo EDL dos ratos controles com aspecto morfológico normal: foram observadas fibras poligonais, com diferentes tamanhos, sarcoplasma acidófilo e núcleos periféricos. As fibras estavam separadas por uma fina camada de tecido conjuntivo, o endomísio.

Após a inoculação do veneno no músculo EDL, o processo de regeneração ocorreu de forma gradual no período analisado. Inicialmente, 24h, ocorreu a degeneração das fibras na área da lesão. Aos 3 e 7 dias a presença de miotubos foi mais freqüente, o que indica que o recrutamento e a formação de fibras ocorreu num processo mais intenso. Após 14 dias as fibras apresentavam-se maiores, porém com aspecto arredondado e muito com núcleos internos. Aos 21 dias o músculo apresentou características normais, embora na maioria das fibras os núcleos estavam localizados no interior das fibras.

A análise do músculo EDL após a realização da imunofluorescência mostrou que após 24 h a média de núcleos marcados foi baixo (8.67), e nos dois seguintes, 3 e 7 dias, os maiores valores, (42.5) e (43.5), respectivamente. Esses valores tendem a diminuir nos dois últimos períodos, 14 e 21 dias (27.83) e (29.67) respectivamente, atingindo taxas estáveis. Os dados obtidos na reação imunohistoquímica corroboram os achados da análise morfológica.

Com base nos resultados obtidos concluímos que o veneno da *B. jararacussu* causou a degeneração do músculo estriado, melhor evidenciada até o 3º dia da inoculação do veneno. Aos 3 e 7 dias, a presença de miotubos demonstra que a formação de fibras ocorreu num processo mais intenso. Após 14 dias, as fibras apresentavam-se maiores, porém com aspecto arredondado e muitas com núcleos internos. Aos 21 dias o músculo apresentou características normais, embora na maioria das fibras os núcleos estavam localizados no interior das fibras.

Referências Bibliográficas

- APPELL, H.J.; FORSBERG, S.; HOLLMANN, W. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: Evidence for muscle fiber neoformation. *Int J Sports Med.*, v.9, p. 297-299, 1988.
- ARCE, V.; BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the *Bothrops asper*: a histochemical and immunochemical study, *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 72, p. 211-226, 1991.

BISCHOFF, R. The satellite cell and muscle regeneration In: Engel A.G., Franzini- Armstrong C. Myology. 2 ed. McGraw-Hill Inc., New York. p.97-118, 1994.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol Theor., v. 62, p.325-372, 1994

CAMPION, D.R. The muscle satellite cell: A review. Int Rev of Cytol., v. 87, p. 225-251, 1984.

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

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofen V, editors. Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press; 1971.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. In "Muscle Regeneration" (A. Mauro, ed.). New York. P. 233-238, 1979.

GROUND, M.D.; YABLONKA-REUVENI, Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. In: Partridge T (ed) Molecular & cell biology of muscular dystrophy. Chapman & Hall. London, p.210-256, 1993.

GUÉRIN, C.W.; HOLLAND, P.C. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. Dev. Dyn., v.202, p.91-99, 1995.

HUGHES, S.M.; BLAU, H.M. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. Nature, v.345, p.350-353, 1990.

MALTIN, C.A.; HARRIS, J.B.; CULLEN, M.J. Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake venom toxin, taipoxin. Cell. Tissue Res., v. 232, p. 565-577, 1983.

MAURO, A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol., v. 9, p. 493-495, 1961.

MAZANET, R.; REESE, B.F.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; REESE, T.S. Variability in the shapes of satellite cells in normal and injured frog sartorius muscle. Dev. Biol., v. 93, p. 22-27, 1982.

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

MILANI Jr. R.; JORGE, M.T.; DE CAMPOS, F.P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J.L.; RIBEIRO, L.A.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.; SANO-MARTINS, I.S.; CARDOSO, D.; IDE FERNANDEZ, C.; FERNANDES, J.C.; ALDRED, V.L.; SANDOVAL, M.P.; PUERTO, G.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Snake bites by jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State. Q.j. Med., p. 90, p. 323-334, 1997.

OWNBY, C.L.; COLBERG, T.R. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). Toxicon, v. 26, p. 459-474, 1988.

QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUES-SIMONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. Toxicon, v. 22, p. 339-346, 1984.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Venomous animals and Their Venoms, Vol. 2, p. 345-403 (Bucherl, W. and Buchel, E.E., Eds.) New York: Academic Press, 1971.

SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F. A eficiência do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. Ver. Inst. Med. Trop., v. 34, p. 153-168, 1992.

VIERCK, J.; O'REILLY, B.; HOSSNER, K.; ANTONIO, J.; BYRNE, K.; BUCCI, L.; DODSON, M. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. Cell Biology International, v.24(5), p. 263-272, 2000.

