



Avaliação da ação antiofídica do especiosídeo isolado de *Tabebuia aurea* em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops moojeni*.

Evaluation of action anti ophidian of the specioside isolated of *Tabebuia aurea* in mice injected with *Bothrops moojeni* venom.

Iluska Senna Bonfá Moslaves¹, Thalita Ximenes¹, Simone Bertozi de Souza Vasconcelo², Luciane Candeloro Portugal², Wander Fernando de Oliveira Filiú³, Carlos Alexandre Carollo⁴, Mônica Cristina Toffoli Kadri^{1*}

¹Laboratório de Farmacologia e Inflamação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Laboratório de Histologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Laboratório de Bioquímica clínica, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<http://www.seer.ufms.br/index.php/pecibes/index>

*Autor correspondente:
Mônica Cristina Toffoli Kadri,
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul - UFMS.
E-mail: monica.kadri@ufms.br

Resumo

Palavras-chave: *Tabebuia aurea*, picada de cobra; fitoterápico.

Key-words: *Tabebuia aurea*, snake bite; phytotherapy.

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos na América do Sul. A *Tabebuia aurea* é usada para minimizar as reações locais e seu extrato hidroetanólico mostrou atividades anti-inflamatória, anti-hemorrágica e antimiotóxica para o veneno de *Bothrops neuwiedi*. A partir disso, o composto majoritário dessa espécie, especiosídeo (Esp), foi isolado e sua ação antiofídica avaliada em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops moojeni* (VBm). Para a determinação das atividades hemorrágica e miotóxica (Swiss machos, 18-30g) os grupos foram VBm, Esp, mistura pré-incubada VBm:Esp (1:100) e Esp após a injeção do VBm (VBm/Esp, 1:100). Os resultados (média \pm E.P.M., ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$) mostraram que o tratamento com Esp, VBm:Esp e VBm/Esp reduziram a concentração de hemoglobina e a liberação de creatina quinase, induzidas pelo VBm. A análise histopatológica do músculo gastrocnêmio dos animais tratados com Esp mostrou fibras preservadas, ausência de hemorragia e redução do infiltrado leucocitário. Em conclusão, o Esp possui potencial atividade antiofídica e pode ser uma alternativa complementar à soroterapia nos envenenamentos ofídicos.

Abstract

The *Bothrops* snakes are responsible for nearly 90% of snake bites in South America. *Tabebuia aurea* is currently utilized to minimize local reactions and its hydroethanol extract showed anti-inflammatory, anti-hemorrhagic and antimyotoxic activities against the venom of *Bothrops neuwiedi*. Thus, the major compound of this species, Specioside, was isolated and its antiophidic potential evaluated in mice treated with the venom of *Bothrops moojeni* (VBm). To determine the hemorrhagic and myotoxic activities, Swiss male mice, 18-30g, were divided in groups as follows: VBm, Esp, preincubated mixture VBm:Esp (1: 100) and Esp after injection of VBm (VBM / Esp, 1: 100). Results (mean \pm S.E.M., ANOVA, Bonferroni test, $p < 0.05$) showed that treatment with Esp, VBm:Esp VBm and/ Esp reduced hemoglobin concentration and release of creatine kinase induced by VBm. Histopathological analysis of gastrocnemius muscle of animals treated with Esp showed preserved fibers, absence of hemorrhage and reduced leukocyte infiltration. In conclusion, Esp has potential antiophidic activity and can be a complementary alternative to the antivenom in cases of snake poisoning.

1. Introdução

As serpentes do gênero *Bothrops* (Viperidae) são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos na América do Sul (Silva et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009) considera-os um importante problema de saúde pública que atinge, principalmente, populações rurais.

O envenenamento botrópico provoca efeitos sistêmicos e reações locais, caracterizadas por vasodilatação, edema, exsudado purulento e dor, atribuídos ao processo inflamatório, além de hemorragia e necrose tecidual (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e Lomonte, 1989). A soroterapia é o tratamento disponível, porém não neutraliza as reações locais, que podem gerar sequelas graves como a perda parcial ou total do membro afetado (Mors et al., 2000; Da silva, 2007).

Segundo um levantamento realizado por Nunes et al. (2003) em Campo Grande, MS, a *Tabebuia sp.* foi citada como anti-inflamatória e cicatrizante, propriedades importantes para minimizar as reações locais induzidas pelo veneno. Entre as espécies do gênero, a *Tabebuia aurea* é empregada no tratamento de envenenamento ofídico por meio da decocção da sua casca (Agra et al. 2007; Hadju e Hohmann, 2012). Ainda, o extrato hidroetanólico dessa espécie (EHETA) mostrou atividades anti-inflamatória, anti-hemorrágica e antimiotóxica para o veneno de *Bothrops neuwiedi* (Reis et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades anti-inflamatória e antiofídica do especiosídeo, isolado de *Tabebuia aurea*, em camundongos injetados com o veneno de *Bothrops moojeni* (Vbm).

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção do Extrato rico em iridóides e isolamento do especiosídeo

O Extrato rico em iridóides, denominado AmberTa, foi obtido a partir do extrato hidroetanólico de *Tabebuia aurea* por meio de uma coluna contendo a resina Amberlite XAD-2 previamente condicionada, após lavagem com excesso de água, aproximadamente 3 L (fluxo 50 mL/minuto) e adição de 1 L de etanol. O especiosídeo (Esp) foi isolado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa.

2.2 Animais e neutralização do veneno de *Bothrops moojeni*

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, 18-30g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, mantidos em gaiolas plásticas à temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água à vontade.

A neutralização do Vbm foi realizada de acordo com o método descrito por Fernandes et al. (2010). O Vbm foi incubado por 30 minutos com o Esp, na proporção de 1:100, Vbm:Esp (m/m), à 37°C , em banho-maria.

2.3 Determinação da atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica induzida pelo Vbm foi

avaliada segundo Nikai et al. (1984), pela formação e mensuração do halo hemorrágico em milímetros. Inicialmente, a Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi determinada como a dose mínima de veneno (μg veneno) capaz de induzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro. Os animais foram distribuídos em grupos que receberam via intradérmica (i.d.) salina (50L), Esp (50 mg/Kg), Vbm (20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), mistura Vbm:Esp (1:100) e Vbm/Esp (1:100). Após três horas, os animais foram submetidos à eutanásia e a área hemorrágica foi delimitada na pele removida. Em seguida, a imagem da lesão foi fotografada, transferida para o *software ImageJ*[®] e a área hemorrágica determinada. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi realizada conforme Rucavado e Lomonte (2000) adaptado de Ownby et al. (1984). Para isso, área hemorrágica delimitada foi fragmentada e acondicionada em tubos de ensaio contendo 1.500 μL de solução de Drabkin[®]. O material foi mantido em geladeira ($2-8^{\circ}\text{C}$) por 12 horas e, em seguida, centrifugado a 700 rpm/15 minutos. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de Hb em fotolorímetro Microchem Analyzer[®] a 540 nm.

2.4 Determinação da atividade miotóxica

A atividade miotóxica induzida pelo Vbm foi avaliada de acordo com método descrito por Gutiérrez et al. (1980) por meio da determinação dos níveis séricos da enzima creatina quinase (CK) e da análise histopatológica do músculo gastrocnêmio. Os animais foram distribuídos em grupos que receberam injeção via intramuscular (i.m.) de salina (50L), Esp (50 mg/Kg), Vbm (20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), mistura Vbm:Esp (1:100) e Vbm/Esp (1:100). Após três horas, os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção retro-orbital para a dosagem de CK. Após, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 , o músculo gastrocnêmio removido e fixado em formaldeído 10% para obtenção de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H/E).

3. Resultados

A injeção intradérmica de Vbm levou ao aumento da concentração de hemoglobina (Vbm, $20,3 \pm 1,4 \text{ g/dL}$) em relação ao grupo que recebeu solução salina 0,9% ($2,3 \pm 0,1 \text{ g/dL}$) e este efeito foi inibido por Vbm:Esp (82,4%) e Vbm/Esp (46,4%) (Figura 1).

No ensaio de miotoxicidade observou-se um aumento dos níveis plasmáticos de CK pelo Vbm ($3892,0 \pm 340,0 \text{ U/L U/L}$) quando comparado ao grupo que recebeu solução salina 0,9% ($738,3 \pm 55,38 \text{ U/L}$). O tratamento com Vbm:Esp reduziu a liberação de creatina quinase, induzida pelo Vbm em 74,3%. Porém, o mesmo não ocorreu com Vbm/Esp. A análise histopatológica do músculo gastrocnêmio dos animais tratados com Esp mostrou fibras preservadas, ausência de hemorragia e redução do infiltrado leucocitário (Figura 2).

4. Discussão

Os resultados apresentados mostram que o Esp diminui a miotoxicidade e a hemorragia após o envenenamento por *B. moojeni*, em camundongos.

No presente estudo, o tratamento com o Esp reduziu a concentração de Hb, o que pode ser explicado pela inibição de metaloproteinases, enzimas capazes de

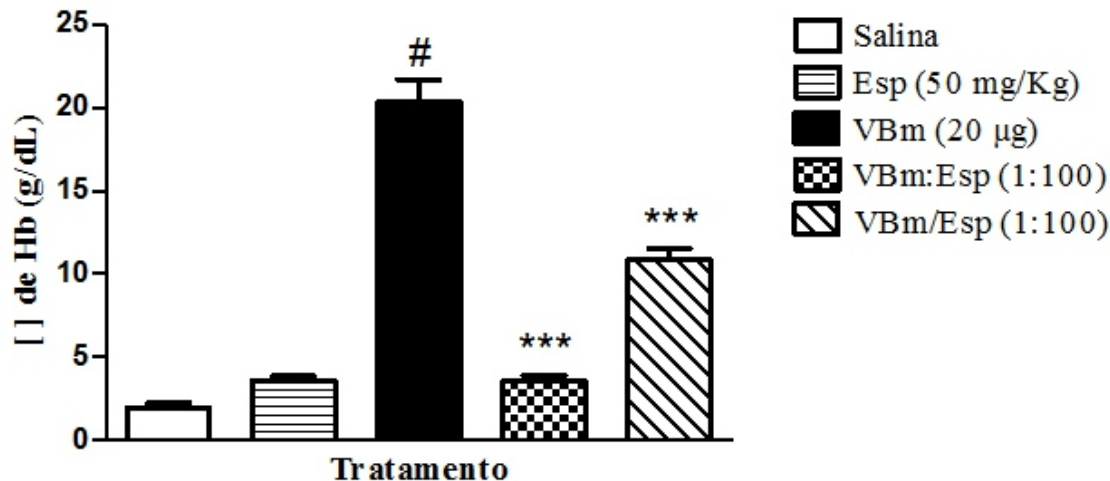


Figura 1: Efeito do tratamento com Especiosídeo sobre a concentração de hemoglobina induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni* (VBm). A concentração de hemoglobina foi determinada três horas após a injeção intradérmica do VBm, do Especiosídeo (Esp), de VBm:Esp e de VmB/Esp na região dorsal de camundongos ($n = 5$). O grupo VBm:Esp recebeu a mistura pré-incubada do VBm com o Esp e o grupo VBm/Esp recebeu a injeção do Esp imediatamente após a injeção do VBm. Resultados expressos como média \pm EPM. ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ (comparado ao grupo que recebeu salina); *** $p < 0,001$ (comparado ao grupo que recebeu VBm).

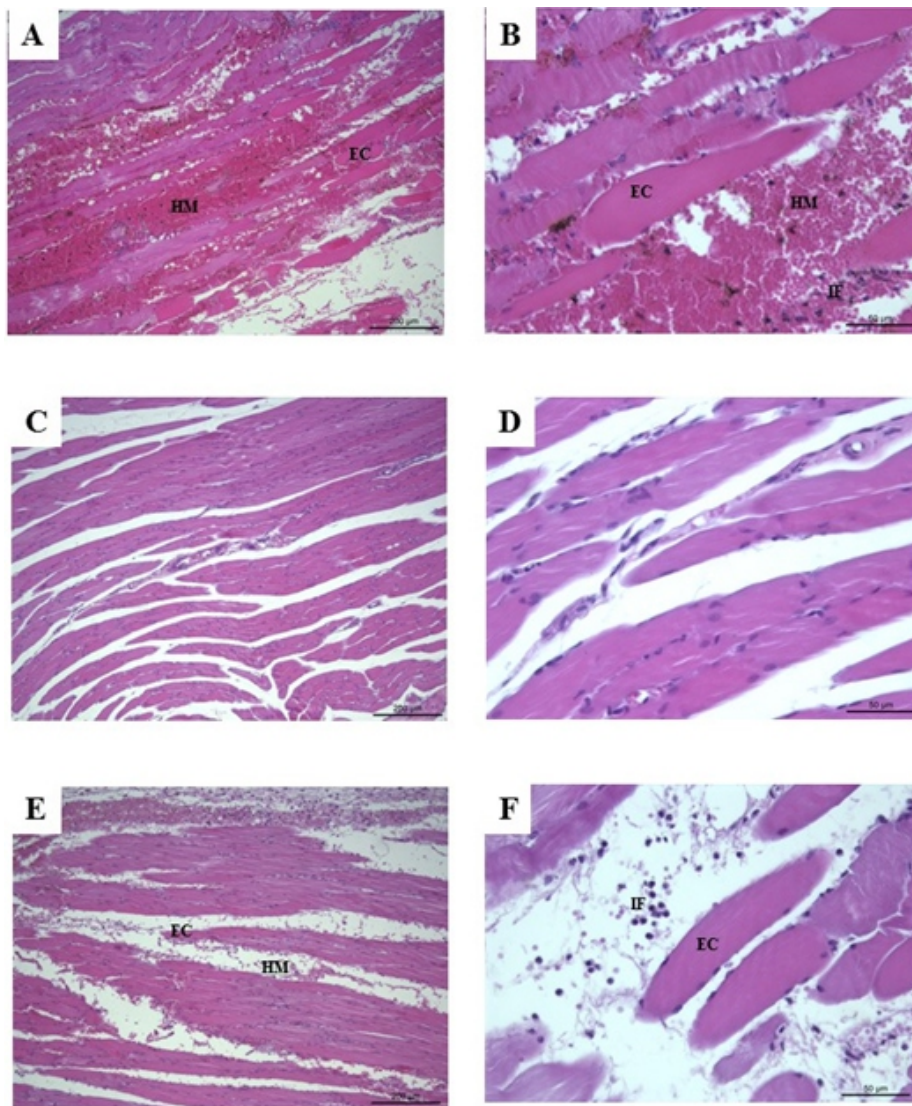


Figura 2: Corte histológico do músculo gastrocnêmio direito de camundongos *Swiss*. Três horas após a administração intramuscular do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm; 20 µg/50 µL; A e B), da mistura VBm:Esp (1:100; C e D) e de especiosídeo (Esp) imediatamente após a injeção do VBm (VBm/Esp; E e F). Fibras musculares necróticas com eosinofilia citoplasmática (EC), hemorragia (HM) e infiltrado leucocitário (IF). Coloração H/E.

induzir hemorragia. O veneno botrópico apresenta elevado teor de metaloproteinases (MP) e estas são as principais responsáveis pela indução de hemorragia, uma vez que acumulam-se em torno de vasos capilares por meio das propriedades adesivas e hidrolisam componentes da matriz extracelular, da membrana basal dos vasos e o colágeno, levando à ruptura do vaso (Baldo et al., 2010). Assim, a partir dos resultados de dosagem da hemoglobina no grupo tratado com a mistura VBm:Esp, que mostrou uma redução significativa da lesão, é possível que o Esp atue no domínio não catalítico destas proteases, interferindo na distribuição e adesão das MP no tecido. Além disso, como estas toxinas dependem de Zn^{2+} para exercer sua ação catalítica, é possível que o Esp seja capaz de complexar este íon, diminuindo assim a ação hemorrágica do veneno.

Nos ensaios de determinação da atividade miotóxica, o Esp reduziu a concentração plasmática de CK, bem como as alterações observadas na análise histopatológica. Esse efeito pode estar relacionado à inibição direta das Fosfalipases 2 (FLA_2) miotóxicas e das MP presentes no venenos pelo Esp. O veneno de *Bothrops moojeni* é composto por miotoxinas sem atividade catalítica (grupo LYS49- FLA_2), que são altamente mionecróticas e também por miotoxinas com atividade catalítica, pertencente ao grupo ASP49- FLA_2 , que na ausência de íons Ca^{2+} apresenta atividade miotóxica reduzida (Calgarotto, 2008). Assim, tanto as miotoxinas que apresentam atividade catalítica, quanto as que não apresentam, podem estar envolvidas na formação da necrose muscular, bem como as FLA_2 celulares, sendo possível que o Esp atue inibindo diretamente estas enzimas, bem como a ação das MP que, ao causarem rompimento de vasos sanguíneos, levam à isquemia do tecido afetado, dificultando a regeneração muscular e ocasionando necrose (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Baldo et al., 2010). Por outro lado, o tratamento VBm/Esp não reduziu a concentração sérica de CK e isso deve ter sido pelo fato do veneno de *Bothrops moojeni* apresentar enzimas que causam mionecrose por mecanismos diferentes e o Esp injetado imediatamente após não ser capaz de inibir os mesmos.

Assim, o Espesiosídeo, isolado de *Tabebuia aurea*, apresenta atividade anti-inflamatória e um potencial efeito antiofídico, provavelmente por inibir a ação de FLA_2 celulares e/ou contidas nos venenos botrópicos, o que representa uma alternativa para a neutralização dos efeitos locais desencadeados pelo veneno botrópico, complementando a soroterapia.

Agradecimentos

Ao CNPq e FUNDECT por fornecer subsídios de pesquisa e à UNIDERP pelo suporte com a extração do veneno.

Declaração: Os autores declaram estar cientes e terem atendido integralmente às normas preconizadas para as pesquisas experimentais de acordo com a Declaração Universal do Direito dos Animais. Os autores declaram ainda ausência de conflito de interesse.

5. Referências

- Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Coelho VPM. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 111, 383-395, 2007.
- Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 4, e727, 2010.
- Calgarotto AK. Caracterização físico-química e biológica de uma fosfolipase A_2 isolada do veneno de *Bothrops moojeni*. 2008. [Dissertação de Mestrado] Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas.
- Da Silva NMV, Arruda EZ, Murakami YLB, Moraes RAM, El-kik CZ, Tomaz MA, Fernandes FFA, Oliveira CZ, Soares AM, Giglio JR, Melo PA. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse. *Toxicon*, 50, 196-205, 2007.
- Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Memoria do Instituto Butantan*, 51, 211-223, 1989.
- Gutiérrez, JM, Lomonte, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33, 1405-1424, 1995.
- Gutiérrez, JM, Arroyo O, Bolaños R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*, 18, 603-610, 1980.
- Hadju Z, Hohmann J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. *Journal of ethnopharmacology*, 139, 838-857, 2012.
- Mors WB, Nascimento, MC, Pereira, BMR, Pereira, NA. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, 55, 627-42, 2000.
- Nikai T, Mori N, Kishida M, Sugihara H, Tu AT. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 231, 309-319, 1984.
- Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JD. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 83-92, 2003.
- OMS (Organização Mundial da saúde). What is snakebite envenoming?, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>. Acessado em: 10/12/2013.
- Ownby CL, Colberg TR, Odell GV. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*, 22, 227-233, 1984.
- Reis FP, Bonfa IMS, Cavalcante RB, Okoba D, Vasconcelos SBS, Candeloro L, Filiu WFO, Monreal ACD, Da Silva VJ, Rita PHS, Carollo CA, Toffoli-Kadri, MC. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic, and hemorrhagic activities induced by the venom of

- Bothrops neuwiedi*. *Journal of ethnopharmacology*, 158, 352-357, 2014.
- Rosenfeld G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South América. Em: Bucherl W, Buckley EE, Deulofeu V, (eds). *Venomous animals and their venoms*. New York, USA: Academic Press, 346-381, 1971.
- Rucavado A, Lomonte B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon*, 34, 567-577, 2000.
- Silva AM, Bernarde PS, Abreu LC. Acidentes com animais peçonhentos no brasil por sexo e idade. *Journal of Human Growth and Development*, 25, 54-62, 2015.

Editor Associado: Rodrigo Juliano Oliveira