

## Efeito da Planta *Sebastiania hispida* no Fígado de Ratos Injetados com Veneno de *Bothrops moojeni*, Correlacionados com Marcadores Enzimáticos e Laser de Baixa Potencia.

### Effect of Aqueous Extract from *Sebastiania hispida* in Liver of Mice Injected with *Bothrops moojeni* Venom, Correlated with Enzyme Markers and Low Power Laser.

<sup>1,2</sup>Doroty M. Dourado; <sup>2</sup>Adriely A. P. Silva; <sup>3</sup>Baldomero Antonio Kato da Silva; <sup>1</sup>Ines A. Tozetti; <sup>2</sup>Maria Helena Fermiano; <sup>4</sup>Jislaine Guilhermino; <sup>2</sup>Rosemary Matias.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, UFMS, Campo Grande-MS, Brasil; Campus Universitário, s/n Cx.P. 549-CEP 79070-900-Campo Grande-MS-Brasil.

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisas em Bioprospecção de Plantas com Potencial Inseticida e Medicinal e Mato Grosso do Sul - Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP). Rua nove, n°. 305, Bairro Boa Esperança, CEP: 78.068-410 - Cuiabá-MT.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí. Campus de Parnaíba. Av. São Sebastião, 2819, CEP 64202-020, Parnaíba-PI.

<sup>4</sup>Meio Ambiente e Saúde: Biodiversidade e Agronegócio. Fiocruz Mato Grosso do Sul-MS-Brasil.

\*Correspondência: e-mail: douradod@uol.com.br

#### Palavras chave:

Enzimas hepáticas; *B. moojeni*; Fitoterápico; Laserterapia.

#### Keywords:

Liver enzymes; *B. moojeni*; Phytotherapeutic; Laser therapy.

## Resumo

Apesar das medidas empregadas no tratamento de acidentados com *Bothrops moojeni* em Mato Grosso do Sul/MS, existem dificuldades ainda de tratamento na região. Este trabalho tem como finalidade avaliar o efeito do extrato aquoso de *S. hispida* no fígado de ratos injetados com veneno de *B. moojeni*, associados a testes de função hepática e laser de baixa potência. Foram utilizados 60 ratos Wistar, divididos em 5 grupos: solução salina (SS), veneno + extrato aquoso de *S. hispida* intraperitoneal (Vb ExtA Sh. i.p.), veneno + extrato aquoso via gavagem de *S. hispida* (Vb ExtA Sh. v.g), veneno laser de baixa potência (Vb Lbp) e veneno bruto (Vb Bm). Os animais foram eutanasiados com Zoletil® em dose excessiva, o órgão foi fixado em paraformaldeído 4%, sendo processado e incluído em parafina para a obtenção de cortes histológicos e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Mason (TM) e Reação do Reativo de Schiff (PAS). Os danos causados pelo veneno bruto de *B. moojeni* foram avaliados através de análises histológicas do tecido e o sangue foi coletado para avaliação enzimática em função do tempo pós-envenenamento e em função dos tratamentos. Histologicamente os grupos tratados com extrato aquoso de *S. hispida* mostraram melhora no tecido lesado pelo veneno, porém o grupo tratado com laser mostrou ação mais promissora em relação aos níveis enzimáticos que foram mais significativos.





## Abstract

Despite the measures employed in the treatment of injured with *Bothrops moojeni* in MS, there are still difficulties of treatment in the region. This work aims to assess the effect of laser therapy and aqueous extract of *S. hispida* and in liver of rats injected with venom of *B. moojeni*, associated with liver function tests. Wistar rats were used 60, divided into 5 groups: saline solution (SS), poison + aqueous extract of *S. hispida* intraperitoneal (i.p. sh. ExtA Vb), poison + aqueous extract via force-feeding of *S. hispida* (Vb ExtA sh. v. g), low power laser poison (Vb Lbp) and crude venom (Vb Bm). The animals were euthanized with Zoletil® in overdose, the organ was fixed at 4% paraformaldehyde, being processed and included in wax for histological and subsequently stained with Hematoxylin-Eosin, Masson's Trichrome and reaction of the Schiff Reactive. The damage caused by the crude venom of *B. moojeni* was assessed by histological analysis of tissue and blood was collected for enzyme evaluation time post-poisoning and depending on the treatments. Histologically the groups treated with aqueous extract of *S. hispida* showed improvement in injured tissue by poison, but catalyzed the laser therapy was more significant.

## Introdução

Os acidentes provocados por serpentes peçonhentas são significativos problemas de saúde pública, principalmente em países tropicais, devido a frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (Pinho e Pereira, 2001).

A letalidade de uma peçonha depende de ações multifatoriais dos componentes da peçonha e depende da ação combinada das toxinas botrópicas (Braud, Bom e Wisner, 2000). Os acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* do qual fazem partes as espécies popularmente conhecidas como jararacas são o mais frequentes, com 87,5% dos casos (Barraviera e Ferreira, 2005).

A peçonha de serpentes da família Viperidae possuem uma potente ação inflamatória, desencadeada rapidamente após inoculação do veneno, afetando drasticamente o tecido muscular, vasos sanguíneos e pele (Gutierrez e Lomonte, 2003). O veneno botrópico é constituído de uma mistura complexa de enzimas, íons metálicos, lipídeos proteínas e peptídeos que são responsáveis pelas ações locais e sistêmicas (Gutiérrez e Lomonte, 1989). A atividade hemorrágica da peçonha de viperídeos é atribuída, principalmente à atuação de metaloproteinases, enzimas proteolíticas com atividade dependente do íon zinco (Rocha e Furtado, 2007).

O fígado como órgão responsável por metabolizar todos os compostos xenobióticos do organismo pode

ser afetado acentuadamente quando o indivíduo é picado por uma serpente peçonhenta, provocando assim uma desordem metabólica considerável. Uma forma de avaliar o dano hepático é por meio de testes de função hepática. As enzimas que identificam dano hepático são: Alanina-aminotransferase (ALT), Aspartato-aminotransferase (AST) e a Fosfatase Alcalina (FA) pode indicar processo de colestase (Schaffner e Schaffner, 1969). A elevação dos níveis sérico-enzimáticos pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose, ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (ALT, AST e LDH) ou do processo de colestase (FA e GGT<sup>1</sup>) (Kaneko, 1989).

O uso de plantas medicinais está atribuído à cultura popular, sendo fonte primária de estudos com plantas como fitoterápicos, as quais podem vir a ser benéficas ao ser humano tornando-se princípio ativo de fármacos. Contudo, uma forma de diminuir os danos que o veneno de *Bothrops moojeni* provoca nos acidentados está o uso de plantas medicinais antiofídicas que são usadas por comunidades que não têm acesso a soroterapia. A flora brasileira possui uma ampla variedade de plantas medicinais com potencial antiofídico, as quais têm sido pouco estudadas cientificamente. Entre as espécies que podem ser empregadas com este fim está a planta *Sebastiania hispida* que é uma planta pioneira encontrada em várias regiões do Pantanal (Pott e Pott, 1994). A planta *S. hispida* apresenta metabólicos secundários, que são de muita importância para estudos fitoterápicos, tais como, triterpenóides, flavonóides, taninos e saponinas (Honda et al.,

<sup>1</sup> Gama-glutamyl-transferase (GGT).





1990). Essa espécie vegetal é considerada invasora das sub-regiões do pantanal da Nhecôlandia (Tomas, Tomas e Rodrigues, 2010) e em períodos mais secos há um aumento em sua abundância. Pertence a família *Euphorbiaceae* que compreende cerca de 290 gêneros e 7.500 espécies aproximadamente, distribuídas em regiões tropicais e inclui muitas plantas utilizadas medicinalmente (Joly, 1966).

Por outro lado, a utilização do laser operando em baixa potência é estudada desde os anos sessenta, e vários trabalhos, têm sido realizados para se verificar e elucidar os efeitos dessa radiação sobre os tecidos, principalmente, como um método alternativo complementar em acidentados (Dourado et al., 2003; Dourado et al., 2007; Dourado et al., 2011). A radiação do laser apresenta efeitos primários (bioquímico, bioelétrico e bioenergético), que atuam em nível celular promovendo aumento do metabolismo, podendo aumentar a proliferação, maturação e locomoção de fibroblastos e linfócitos, intensificar a reabsorção de fibrina, aumentar a quantidade de tecido de granulação e diminuir a liberação de mediadores inflamatórios, acelerando assim o processo de cicatrização (Arruda et al., 2007; Felice et al., 2009). A diferença entre os vários tipos de lasers é dada pelo comprimento de onda, quanto menor o comprimento de onda, maior sua ação e poder de penetração podendo ser contínuos ou pulsáteis (Dallan e Oliveira, 2000).

## Material e Métodos

### Extrato Aquoso

A amostra de *S. hispida* (*Euphorbiaceae*) foi coletada na fazenda Santa Emília, localizada no Pantanal do Rio Negro/MS, e transportada para o laboratório de Produtos Naturais da Universidade Anhanguera-Uniderp. Uma amostra do vegetal foi utilizada para preparação da exsiccata e registro no herbário. As folhas frescas, foram limpas, pesadas e submetidas a secagem em estufa circuladora de ar forçado, após esses procedimentos as amostras foram pesadas novamente. As folhas foram particionadas em blocos de 4 folhas e trituradas separadamente, em seqüência armazenadas em frasco de polietileno hermeticamente fechado de 100mL. O extrato foi preparado a partir de uma partição do extrato metanólico da mesma. A metodologia para preparação do extrato utilizada neste experimento foi estabelecida a partir de dados obtidos junto à comunidade local que aponta o uso diário recomendado para um homem de 70 kg, que corresponde à ingestão diária de até 1000 mL da solução preparada a partir de 4 folhas secas de *S. hispida* (*Euphorbiaceae*). O extrato foi mantido envolto em papel alumínio para evitar possível oxidação e sob refrigeração de 8°C, inibindo assim a presença de fungos.

### Veneno

O veneno bruto foi extraído de serpentes *Bothrops moojeni* e, após, foi seco em dessecador a 20°C no momento de uso foi diluído em 50µl solução salina (0,9% NaCl) (0,4mg/kg).

### Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus albinus novergicus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, pesando aproximadamente 200-300 g (n=4). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração e água *ad libitum* em condições ambientais apropriadas. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP com parecer nº 2557-1.

### Laser

Foi utilizado o Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III, (equipamentos LTDA São Carlos – SP, Brasil), diodo que é um semicondutor com meio ativo de InGaAlP (laser vermelho) com potência de 100mW, área do feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, e comprimento de onda de λ 660nm, meio ativo de Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) com densidade de energia de 4 joules/cm<sup>2</sup> e tempo de 40 segundos. Logo após a injeção do veneno bruto (40 µg/mL) o músculo gastrocnêmio foi irradiado, uma vez ao dia, com dosagem em joules por centímetro quadrado (J/cm<sup>2</sup>) nos períodos estipulados consecutivos com a primeira aplicação realizada logo após a injeção do veneno de *B. moojeni*. Para as sessões de irradiação, o rato foi acondicionado dentro de um tubo de plástico com uma abertura na região superior permitindo sua imobilização e posicionado para receber as sessões de irradiação, conferindo manipulação segura e a incidência do feixe de luz perpendicularmente sobre a área afetada pelo veneno. O aparelho foi colocado aproximadamente a 1 cm de distância do ferimento, sendo o mesmo procedimento para todos os animais irradiados, com irradiação controlada automaticamente pelo aparelho. O laser foi aplicado diretamente na pele tricotomizada do lado direito da saliência média do músculo gastrocnêmio. O ângulo da incidência dos raios laser foi mantido perpendicular (90°) sobre a superfície de irradiação. Foi irradiado em 3 pontos (4J) por 40 segundos.

### Grupos

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=4) por período determinado. Grupo SS: injetado com solução salina estéril 0,9 % (0,1 mL/100g de peso corporal); Grupo Vb B.m (40 µg/ml (0,4 mg/kg): injetado com solução de veneno bruto de *B. moojeni*; Grupo Vb ExTA Sh. v.g.: injetado com veneno bruto e tratado de imediato com o extrato aquoso das folhas de *S. hispida*, diariamente via gavagem; Grupo Vb ExTA Sh. i.p.: in-





jetado com veneno bruto e tratado de imediato com o extrato aquoso das folhas de *S. hispida*, diariamente via intraperitoneal na dosagem de 1ml por indivíduo; Grupo Vb Lbp: injetado com veneno bruto e tratado com laser por 40 segundos em 3 pontos (4J).

Os tempos para a eutanásia dos animais foram 3h, 3 e 7dias. A via de inoculação do veneno foi intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmico direito, enquanto que da solução salina foi intraperitoneal e do extrato aquoso da planta foi por duas vias: via gavage e intraperitoneal na dosagem de 1 ml para cada indivíduo e o laser foi irradiado no músculo gastrocnêmico direito. O peso e o consumo de ração foram medidos a cada dois dias para verificar se os animais estavam se hidratando e alimentando.

### Estudos morfológicos

Ao termino dos períodos de 3h, 3 e 7dias os ratos foram eutanasiados com Zoletil® (i.p.) em dose excessiva na concentração referente ao peso do animal, ou seja, a cada (100g/0,1ml). Após a indução anestésica realizou-se uma incisão na região ventral do animal, ocasionando a exposição da estrutura interna do mesmo sendo feita a coleta de sangue por punção cardíaca. Com auxílio de tesoura curta o fígado foi retirado, pesado e medido e imerso em solução de paraformaldeído 4% a base de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,4 por 24 horas, processados, incluídos em parafina, cortados em micrótomo rotativo com aproximadamente 5µm de espessura.

Os cortes histológicos do fígado foram corados através Hematoxilina e Eosina (HE), Reação do Reativo de Schiff (PAS) e Tricômico de Mason (TM), para posterior leitura de lâminas através de microscopia, com o auxílio do programa Imagemlab 3000.

### Estudos Enzimáticos

Para determinar os níveis séricos de AST, ALT e FA dos grupos SS, Vb Bm., Vb ExtA Sh. v.g., Vb ExtA Sh. i.p. e Vb Lbp amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca diretamente em tubos com heparina. Imediatamente depois de coletadas as amostras de sangue foram centrifugadas (2000 rpm/25 min) para a separação do soro. A determinação dos níveis de AST, ALT e FA no sangue foram realizadas por meio de um procedimento Cinética-Colorimétrico. Para isso foi utilizado um "kit" Gold Analisa-Diagnóstica cujos resultados foram expressos em unidades por litro (U/L), seguindo as especificações estipuladas pelo fabricante. O equipamento utilizado para as análises foi o espectrofotômetro.

### Análise estatística

As medidas das variáveis foram expressas em média ± desvio padrão. Os dados foram expostos de

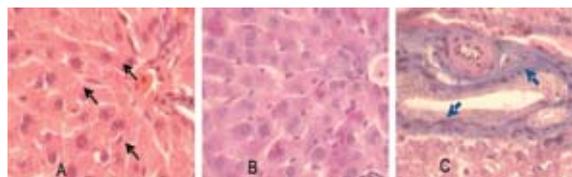
modo a se comparar as alterações enzimáticas. Para comparação entre os grupos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com *post hoc test* de Tukey. Consideraram-se como significantes as comparações com  $p \leq 0,05$ .

## Resultados e Discussão

### Análise Histológica

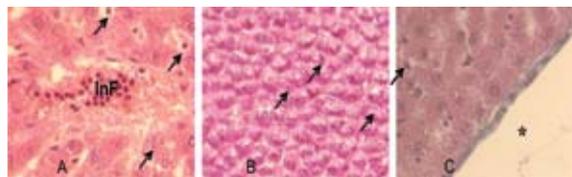
O grupo solução salina não apresentou danos em sua estrutura como mostra a figura 1. Os hepatócitos estavam com o núcleo evidente e com o citoplasma conservado. E o colágeno ao redor dos vasos com aspecto normal.

**Figura 1: Imagens em microscopia de luz do grupo solução salina.** (A) hepatócitos preservados (setas) (3 horas) HE/400x. B (3 dias) pouco acúmulo de glicogênio nos hepatócitos, PAS/400x. C (7 dias) colágeno ao redor dos vasos bem preservados (setas azuis), TM/400x.



No grupo veneno os danos ao órgão estavam bem evidentes como degeneração hepatocelular com vários hepatócitos comprometidos e muitos pontos de inflamação linfocitária e hepatócitos vacuolizados (Figura 2A). A arquitetura do fígado apresentava-se desorganizada, com aumento de glicogênio nos hepatócitos (figura 2B) e as fibras colágenas ao redor dos vasos eram finas e escassas (figura 2C).

**Figura 2: Imagem em microscopia de luz do grupo veneno.** (A) (3 horas) hepatócitos vacuolizados e células em cariólise (setas) e inflamação focal (InF), HE/400x. B) (3 dias) aumento de glicogênio nos hepatócitos (setas), PAS/400x. C) (7 dias) verifica-se o tecido de revestimento do fígado (\*), TM/400x.

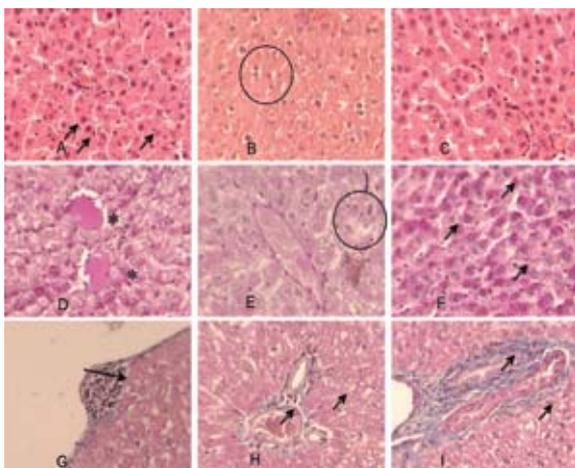


No grupo tratado com Extrato Aquoso de *S. hispida* via intraperitoneal observou-se que no período de 3 horas o órgão apresentou alguns danos, que estavam mais acentuados aos 3 dias e amenizados aos 7 dias (figura 3).



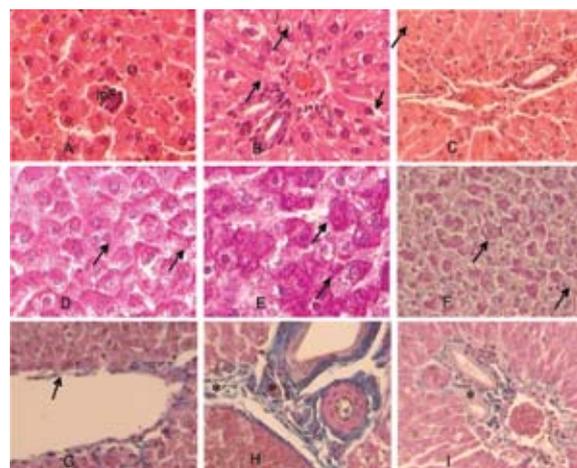


**Figura 3: Imagem em microscopia de luz grupo tratado com *S. hispida*.** (A) (3 horas) células de Kupffer evidentes (setas). B) (3 dias) área com degeneração citoplasmática com hepatócitos vacuolizados. C) (7 dias) órgão com hepatócitos preservados. HE/400x. D) (3 horas) deposição proteinácea (\*). E) (3 dias) degeneração citoplasmática, centro lobular PAS positivo. F) (7 dias) hepatócitos acumulo de glicogênio (setas). PAS/400x. G) (3 horas) Infiltração linfocitária (seta). H) (3 dias) camada delgada de tecido conjuntivo entorno dos vasos (setas). I) (7 dias) fibras colágenas mais espessas ao redor dos vasos (setas). TM/400x.



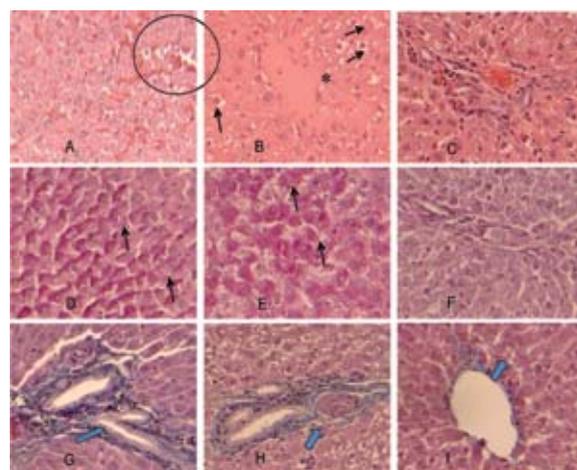
O grupo tratado com extrato aquoso de *S. hispida* via gavagem (v.g) observou-se em 3 horas, processo inflamatório linfocitário focal (InF), lesão do endotélio e aos 3 dias, algumas células estavam em degeneração, em 3 horas e 3 dias ocorreu uma pronunciada acumulação de glicogênio nos hepatócitos (figura 4D e E). Aos 7 dias observou-se poucas alterações no órgão (figura 4).

**Figura 4: Imagem em microscopia de luz grupo tratado com *S. hispida*.** (A) (3 horas) inflamação linfocitária focal (InF). B) (3 dias) arquitetura do fígado aparentemente normal, com alguns hepatócitos em degeneração citoplasmática (hepatócitos vacuolizados) (setas). C) (7 dias) hepatócitos com o núcleo e citoplasma bem preservados, sem anormalidades. HE/400x. Em 3 horas (D), 3 dias (E) e 7 dias (F) Acúmulo de glicogênio nos hepatócitos (setas). PAS/400x. G) (3 horas) lesão do endotélio e tecido conjuntivo em volta dos vasos com pouco colágeno (setas). Em 3 dias (H) e 7 dias (I) fibras colágenas rompidas (\*). TM/400x.



No grupo tratado com o laser os danos estavam acentuados em todos os períodos do experimento com acentuada congestão vascular entre os hepatócitos (figura 5A), deposição proteica nos vasos e degeneração dos hepatócitos (figura 5B), inflamação no espaço de Disse (figura 5C), deposição de glicogênio nos hepatócitos (figura 5D, E), fibras colágenas nos vasos estavam preservadas (figura 5G, H, I).

**Figura 5: Imagem em microscopia de luz grupo tratado com laser InGaAIP.** A) (3 horas) acentuada congestão vascular (círculo). B) (3 dias) hepatócitos vacuolizados (setas) e deposição proteinácea(\*). C) (7 dias) o órgão apresenta uma melhora no arranjo estrutural, HE/400x. 3 horas (D), 3 dias (E) podemos notar um aumento de glicogênio no órgão. Em F (7 dias) há um decréscimo desse glicogênio, PAS/400x. Em 3 horas (G), 3 dias (H) e em 7 dias (I) preservação das fibras colágenas nos vasos (setas azuis), TM/400x.





Neste trabalho, observou-se no grupo controle (SS) que o órgão apresentava arquitetura bem preservada e células em seu padrão de normalidade em todos os períodos do experimento (figura 1A, B e C). No grupo veneno o órgão estava muito lesionado, com muitos hepatócitos em cariólise, degeneração citoplasmática, excesso de glicogênio e a arquitetura do fígado estava desorganizada (figura 2A, B e C).

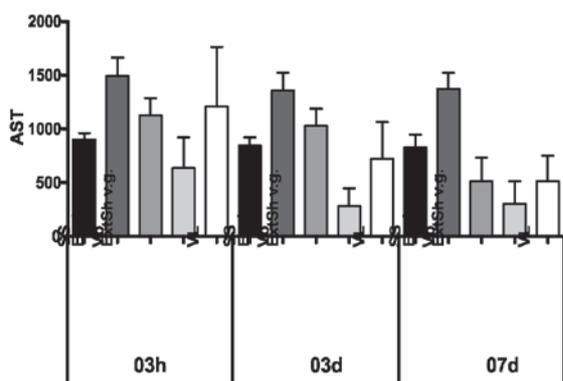
Entretanto nos grupos tratados com extrato aquoso esses danos foram moderados. No decorrer dos experimentos no período de 3 dias podemos notar uma melhora na arquitetura do órgão comparando-se ao grupo veneno. No período de 3 horas mesmo com o uso de extrato aquoso de *S. hispida* via intraperitoneal ou via gavagem, o órgão apresentou alguns danos (figura 3A, D e G; Figura 4A, D e G). Aos 3 dias de experimento os danos eram menos evidentes e o arranjo estrutural do órgão estava se aproximando da normalidade (figuras 3 e 4B, E e H). Ao sétimo dia do experimento a toxicidade do veneno era menos agressiva e dessa forma o órgão apresentou hepatócitos mais preservados (Figura 3 e 4C, F e I).

No grupo tratado com laser os danos no tecido hepático estavam presentes em todos os períodos do experimento, porém o colágeno dos vasos estava mostrando-se preservado em todos os períodos (figura 4).

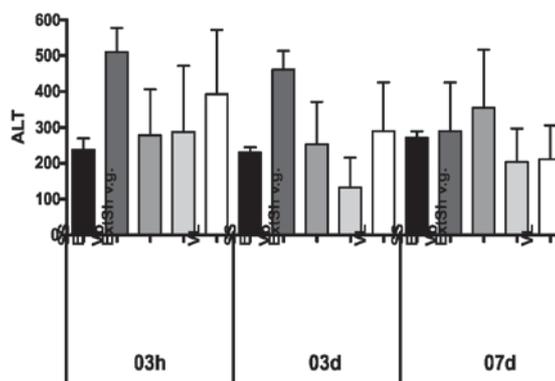
## Análise enzimática

Para a análise estatística os dados foram avaliados através do teste ANOVA, com post hoc test de Tukey.

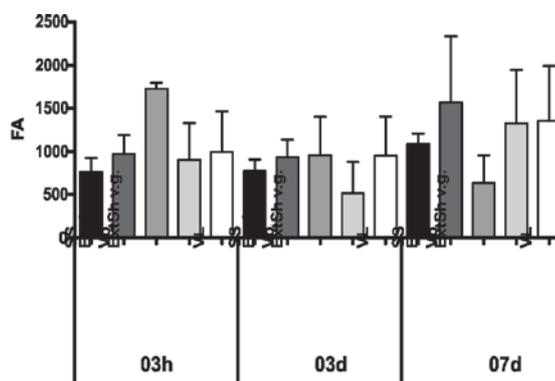
**Figura 6: Níveis séricos para a enzima Aspartato Aminotransferase (AST) entre os grupos.** SS: grupo salina (controle); Vb: grupo veneno; ExtShi.p.: grupo tratado com extrato aquoso de *S. hispida* via intraperitoneal; ExtShv.g.: grupo tratado com extrato aquoso *S. hispida* via gavagem; VL: grupo laser



**Figura 7: Níveis séricos para a enzima Alanina Aminotransferase (ALT) entre os grupos.** SS: grupo salina (controle); Vb: grupo veneno; ExtShi.p.: grupo tratado com extrato aquoso de *S. hispida* via intraperitoneal; ExtShv.g.: grupo tratado com extrato aquoso *S. hispida* via gavagem; VL: grupo laser



**Figura 8: Níveis séricos para a enzima Fosfatase Alcalina (FA) entre grupos.** SS: grupo salina (controle); Vb: grupo veneno; ExtShi.p.: grupo tratado com extrato aquoso de *S. hispida* via intraperitoneal; ExtShv.g.: grupo tratado com extrato aquoso *S. hispida* via gavagem; VL: grupo laser



Na análise intragrupos da enzima AST houve diferença significativa entre os períodos de 3h x 3dias ( $p < 0,01$ ) e nos períodos de 3h x 7dias ( $p < 0,001$ ) no grupo tratado com laser e na análise intergrupos não houve diferença estatística em relação a essa enzima (figura 6).

Houve diferença significativa da enzima ALT entre os períodos de 3h x 3 dias ( $p < 0,01$ ) e 3h x 7dias ( $p < 0,001$ ) no grupo tratado com laser na análise intragrupos, na análise intergrupos houve diferença significativa no período de 3 dias entre o grupo veneno e grupo tratado com extrato aquoso via gavagem ( $p < 0,05$ ), e no período de 7 dias entre o grupo veneno e os grupos tratados com extrato aquoso (as duas vias) e laser ( $p < 0,05$ ) (figura 7).





A enzima FA apresentou diferença significativa na análise intragrupos entre no grupo veneno entre os períodos de 3h x 3dias ( $p < 0,05$ ) e no período de 3h x 7dias ( $p < 0,05$ ), porém na análise intergrupos não houve diferença estatística (figura 8).

Os acidentes ofídicos constituem um sério problema médico, social e econômico no Brasil e 90% desses, são causados por espécies do gênero *Bothrops* (Farias, 1999). O veneno botrópico é constituído por uma complexa mistura de enzimas, toxinas e peptídeos, que produz um quadro patofisiológico caracterizado por alterações locais (inflamação, edema, formação de vesículas, necrose e intensa dor) e alterações sistêmicas (hemorragia, choque hipovolêmico e desordens da coagulação), que podem levar a falência renal aguda (British Herbal Pharmacopoeia, 1996; Magalhães, 2001).

O fígado é um órgão de choque e simultaneamente da resposta tóxica e do trauma agudo. Em vista disso, é possível especular que o fígado nos acidentes ofídicos deve se comportar como um órgão que responde ao trauma de maneira inespecífica (Barraviera et al, 1995; Fonseca e Barraviera, 2003).

Os danos encontrados nesse trabalho corroboram com a literatura e ocorrem devido ao efeito sistêmico das toxinas botrópicas presentes em venenos de serpentes da família Viparidae em função da ação inflamatória potente, desencadeada rapidamente após o envenenamento (Gutierrez; Lomonte, 2003) provocando alterações histopatológicas (Benvenuti, 2003). Vários estudos relacionados às proteínas presentes no veneno do gênero *Bothrops*, afirmam que as metaloproteinases e as fosfolipases A2 são as responsáveis pelo rápido aparecimento da hemorragia no local da picada e intensa mionecrose (Lucena, Mendes e Homs-Brandeburgo, 2009; Cavalcante et al., 2007).

O uso empírico de plantas como tratamento para enfermidades têm fornecido subsídios para estudos de plantas com potencial anti-ofídico. Estudos anteriores constataram que plantas ricas em triterpenos e flavonóides atuam como agentes terapêuticos com função anti-inflamatória, anti-oxidante e protetora do sistema vascular (Conolly e Hill, 2002; Heim, Tagliarferro e Bobilya, 2002) esses compostos estão presentes na planta *S. hispida*. No estudo dos efeitos de uma pomada a base de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) em camundongos houve diminuição do processo hemorrágico e miotóxico, com grande neutralização dos efeitos locais do veneno de *Bothrops pauloensis* (Lucena, Mendes e Homs-Brandeburgo, 2009). O estudo realizado com *Agaricus Blazei* Murril como fitoterápico anti-ofídico apontou resultados positivos em relação aos óbitos que foram reduzidos no grupo experimental e ressalta sobre os aumentos séricos das enzimas AST e ALT no envenenamento bo-

trópico onde *A. blazei* possui ação inibitória de lesão hepática (Ferreira, Melo e Dantas – Barros, 2003).

Outro estudo realizado com a administração de extrato etanólico e aquoso do caule de *L. reticulata* demonstrou atividade hepatoprotetora significativa, o que era comparável com a silimarina droga padrão, sendo o efeito mais pronunciado com o extrato etanólico (Nema, Agarwal, Kashaw, 2011). As investigações qualitativas fitoquímicas com o extrato etanólico de *L. reticulata* também apresentaram resultado positivo para flavonóides correlacionado com propriedades antioxidantes (Hesham; Shgeru, 2002) e foi encontrado para ser útil no tratamento de danos no fígado, visto que *L. reticulata* tem atividade hepatoprotetora significativa.

A ação tóxica sobre os hepatócitos manifesta-se por alterações das enzimas hepáticas como alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase (Mohamed et al., 1981). O efeito sistêmico do veneno permite que a sua toxicidade chegue ao fígado, provocando danos estruturais como rompimento de hepatócitos, necrose e comprometimento das funções do órgão, esses danos foram encontrados neste estudo.

As lesões do fígado associadas a agentes químicos abrangem desde alterações bioquímicas até lesões morfológicas com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou da estrutura celular, o aumento do nível das enzimas é um dos marcadores mais sensíveis de doença hepática produzida por toxinas (Brasileiro Filho, 2004). Os níveis séricos da AST, ALT e FA foram estudados para o envenenamento de *Crotalus durissus cumarensis* apresentando resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho (Alvarado et al., 2009).

A laserterapia atualmente tem sido avaliada como tratamento para acidentes ofídicos. Em um estudo do efeito do laser Arsenieto de Gálio (904 nm) no músculo Tibial anterior de camundongos na dose de 1,5J ou 3J, notou-se que com a dosagem de 3J houve melhora na regeneração muscular causada pela injeção da crotoxina (Gutiérrez, 2010). Há poucos estudos em relação ao tratamento da laserterapia em função do efeito sistêmico das serpentes do gênero *Bothrops*, porém os estudos realizados em função ao efeito local da picada têm mostrado efeitos positivos com a diminuição do edema, mionecrose e processo inflamatório (Barbosa et al., 2008; Dourado et al., 2003; Dourado et al., 2007; Dourado et al., 2011; Moura, 2009).

O resultado observado no grupo experimental com laser observou-se aumento aos 7 dias das fibras colágenas no fígado. Isso ocorre devido ao efeito bioquímico, bioelétrico e bioenergético do laser que interagem com o tecido provocando melhoras no tecido lesado, na cicatrização (Arruda et al., 2007; Felice, et al., 2009) e como consequência a diminuição da ação tóxica do veneno.





## Conclusão

O uso da planta *S. hispida* apresentou resultados positivos em relação à ação do veneno no fígado, diminuindo os efeitos tóxicos no órgão no decorrer dos experimentos, apontando um efeito protetor da planta. Enzimaticamente esses efeitos não foram os mesmos em relação à planta, que apontou um decréscimo nos níveis séricos, porém esses efeitos foram mais significantes nos grupos tratados com o laser de baixa potência.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT); INAU (Instituto Nacional de Áreas Úmidas), Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP); Universidade Anhanguera – Uniderp.

## Referências

Alvarado, J.N.; Colmenarez, D.; Mogollón, A.; Márquez, N.; Hernández, V. e Pérez, M. 2009- Cambios séricos en las enzimas alt, ast, fa, ck-total y ldh inducidos por veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones balb/c. *Journal Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*, v.19, p.408-413.

Arruda, E. R. B.; Rodrigues, N. C.; Taciro, C. e Parizotto, N. A. 2007- Influência de diferentes comprimentos de onda da Laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, v.11, p.283-288.

Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B.; Guimarães-Souza, L.; Ribeiro, W.; Cogo, J.C. e Zamuner, S.R. 2008- Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* v.51, n.7, p.1236-1244.

Barraviera, B.; Coelho, K. Y.; Curi, P. R. e Meira, D. A. 1995- Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus Durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of Sao Paulo, Brazil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 17, n. 1, p. 63-69.

Barraviera, B. e Ferreira JR, R.S. 2005- *Acidentes off-dicos*. In: Veronesi R.: Veronesi: tratado de infectologia. Atheneu, São Paulo.

Benvenuti, L.A. 2003- *Anatomia patológica nos acidentes por animais peçonhentos*. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Junior, V.H. (Org.). *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Savier, São Paulo, p.347-355.

Brasileiro Filho, G. 2004- *Patologia Geral*. 3ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Braud, S.; Bom, C. e Wisner, A. 2000- A Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, v.82, p.851-859.

British Herbal Pharmacopeia. , 1996 - 4.ed., Bournemouth: British Herbal Medicine Association.

Cavalcante, W. L. G.; Campos, T. O.; Pai-Silva, M. O.; Pereira, P. S.; Oliveira, C. Z.; Soares, A. M. e Gallacci, M. 2007- 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.

Connolly, J. D. e Hill, R. A. 2002- Triterpenoids. *Natural Products Report*, v.19, p.494-513.

Dallan L. A.O. e Oliveira S.A. 2000- Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO2. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, v.15, p.89-104.

Dourado, D.M.; Favero, S.; Baranauskas, V. e Cruz-Hofling, M.A. 2003- Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.33, p.352-357.

Dourado, D.M.; Matias, R.; Almeida, M.F.; De Paula, K.R.; Vieira, R.P.; Oliveira, L.V.F. e Carvalho, P.T.C. 2007- The effects of low-level laser on muscle damage caused by *Bothrops neuwiedi* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.14, p. 423-434.

Dourado, D.M.; Fávero, S.; Matias, R.; Carvalho, P.D.E.T. e Da Cruz-Höfling, M.A. 2011- Low level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in endothelial and nonendothelial cells of mice gastrocnemius exposed to snake venom. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.87, p. 418-26.

Farias, M.R. 1999- Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (coord.). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*, Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, p.197-220, Porto Alegre –Florianópolis.

Felice, T. D.; Pinheiro, A. R.; Menchik, E. D. S.; Silva, A. C. D.; Souza, L. S.; Caires, C.S.A.; Abel, A.; Bartmeyer, C.G.; Oliveira, J.G.; Assis, T.B.; Silva, L.A.; Lopes, T.F.; Felipe, L.A. e Pinheiro, A.R. 2009- Utilização do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. *Interbio*. v.3(2) p.42-52.





- Ferreira, K. M.; Melo, M. M. e Dantas-Barros, A. M. 2003- Tratamento tóxico de coelhos com *Agaricus blazei* Murrill após envenenamento botrópico experimental. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, p.77-80.
- Fonseca, M. G e Barraviera, B. 2003- Reação inflamatória aguda no envenenamento ofídico avaliado através dos níveis séricos de proteína C reativa e mucoproteína. *Revista Hispica & Lema*, v.7, p. 42-44, 2003.
- Gutiérrez, J. M. e Lomonte, B. 1989- Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: A Review. *Memórias do Instituto Butantan*, v.51, p. 211-223.
- Gutiérrez, J. M. e Lomonte, B. 2003- Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América latina, p.310-323, In: Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S. e Wen, F. H. *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Savier, São Paulo.
- Gutiérrez, R. M. S. 2010- *Efeito da irradiação do laser Arseneto de Gálio (GaAs; 904 nm) na regeneração de músculos esqueléticos de camundongos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Cidade De São Paulo - UNICID, São Paulo.
- Hesham R. E. e Shgeru N., 2002 - Chemistry of bioflavonoids. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*; v.36, p.191-194.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. e Bobilya, D. J. 2002- Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.572- 584.
- Honda, N. K.; Garcez, W. S.; Garcez, F. R.; Conceição, C. A. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. *Revista Científica e Cultural UFMS*, v. 5, p. 37-46, 1990.
- Joly, A. B. 1966- *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*, Cia Editora Nacional, 634p. (Ciências Puras, v.4). São Paulo.
- Kaneko, J. J. 1989- *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic, San Diego.
- Lucena, M. N.; Mendes, M. M. e Homs-Brandeburgo, M. I. 2009- Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. *Horizonte Científico*. v.3, n.1, p.1-29.
- Magalhães, P. M., 2001- O que é qualidade pós-colheita em plantas medicinais? *Agroecologia Hoje*, Botucatu, n.6, p. 22-23.
- Mohamed, A. H.; Fouad, S.; El Aasar, S.; Salem, A. M.; Abdel-Aal, A.; Hassan, A. Zahran, F.; Abbas, N. 1981- Effects of several snake venoms on serum and tissue transaminases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase. *Toxicon*, v.19, p.605-609.
- Moura, K. M. B. 2009- Ação do veneno de *Bothrops leucurus* e da radiação laser. UNIVAP São José dos Campos.
- Nema, A. K.; Abhinav, A. e Varsha, K. 2011- Hepatoprotective activity of *Leptadenia reticulata* stems against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, v.43, n.3, p. 254-257.
- Pinho, F. M.; Pereira, I. D. 2001- Ofidismo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.47, n.1, p.24-29.
- Pott, A. e Pott, V. J. 1994- *Plantas do Pantanal*. Corumbá: EMBRAPA Pantanal. 1ª Edição. Mato Grosso do Sul.
- Rocha, M. M. T. e Furtado, M. de F. D. 2007- Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v.24, p.410-418.
- Schaffner, J. A. e Schaffner, F. 1969- Avaliação das condições do fígado. In Henry, R.J. *Bioquímica*, Ed. Jims, Barcelona.
- Tomas, M. A.; Tomas, W. M. e Rodrigues, F.H.G. 2010- Importância da *Sebastiania hispida* para o Veado-Campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, em períodos de seca no Pantanal. In: 5º Simpósio sobre recursos naturais e sócio econômicos do Pantanal, Corumbá.

**Recebido em março de 2012. Aceito em outubro de 2012**

