



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Avaliação do efeito do veneno de *Bothrops atrox* sobre baços de camundongos tratados com o extrato de *Bellucia dichotoma* Cong.: um estudo estereológico

Trabalho de Dissertação apresentado à Universidade Federal do Amazonas – UFAM, para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Agentes Patogênicos.

Aluna: Marissa Braga dos Anjos

Orientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Manaus/AM
Setembro/2017

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Senhor Jesus pelo seu amor incondicional e por ter estado ao meu lado, Ele é meu grande mestre e a minha mãe Maria da Saúde por ter sido um instrumento de incentivo, fé e companheirismo em todos os momentos.

Agradecimentos

Como é maravilhoso para mim, poder agradecer.

Primeiramente ao **Senhor Jesus**, por ter me permitido e capacitado a trabalhar nesse prazeroso projeto, no qual apreciei experiências que vou levar por toda vida. Toda honra é para Ti, Senhor.

À minha mãe **Maria da Saúde Braga dos Anjos**, que não mediu esforços, palavras de ânimo e estrutura para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Mãezinha essa conquista é sua também. Minha gratidão é imensurável.

Ao meu orientador prof. Dr. **Oscar Tadeu Ferreira da Costa**, pelo acolhimento, ensinamentos e por mostrar que a pesquisa é um mundo delicioso. Obrigada pelos puxões de orelha, por acreditar no meu trabalho e por ser mais que um orientador, um amigo. Minha eterna gratidão.

À técnica **Erilene do Carmo**, conhecida como Lene Maria, por dividir sua experiência técnica e pela boa vontade de ajudar. Suas brincadeiras e momentos de descontração no laboratório são lembranças guardadas em meu coração.

À Dra. **Valéria Mourão**, por ter cedido suas amostras, pela paciência em me ensinar algo novo e por toda ajuda científica. Tenho admiração pelo seu trabalho. Obrigada por tudo.

À Dra. **Maria Cristina dos Santos**, pelo apoio científico, instrução e parceria na elaboração desse projeto. Muito grata.

À Mrs. **Juliana Lameiras**, pela ajuda nos programas de informática e na colaboração no desenvolvimento do projeto.

Ao **laboratório de morfologia quantitativa**, pelo espaço cedido e por proporcionar as ferramentas necessárias para desenvolver projeto. Sei também que ganhei uma família. Gratidão.

Ao **laboratório de Microscopia Eletrônica** do Inpa pela aquisição das fotos, em especial ao **Lucas Castanhola** por toda assistência dada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Ppgiba. Em especial **Aya Sadahiro, Adriana Malheiro, Antônio Luiz Boechat, Luís André Mariúba e Pritesh Lalwani**, por todo conhecimento adquirido.

A todos os amigos de mestrado da turma 2015, no qual tive o privilégio de estudar, dividir conhecimento, experiências únicas e grande união que se tornou amizades valiosas. Em especial **Adriane Batalha, Camila Soares, Anne Caroline Santos, Heidy Halanna, Nadielle Pereira e Vanessa Alves**, pelo companheirismo e cumplicidade. Vou levar a nossa amizade por toda vida.

Aos amigos **Rosmery e Dario**, pela amizade, amparo e moradia.

A toda **família Jorge**, em especial **Adriane Jorge**, que foram anjos de Deus no momento que mais precisei. Obrigada pela moradia, amparo e amor.

Aos amigos conquistados na histologia, **Rosilene Campos, Maiza Conceição, Ivone Maria, Nerci Nina, Maylla Leão, Luiz Pedro, Andrew Wischneski, Violeta Areosa, Daíse e Rafael Maciel dos Santos**.

Ao seu **Zé**, pelas ilustres tapiocas e o cafezinho sempre bem quente que renovava as forças.

Ao meu **grupo de amigas (Ga)**, por me apoiarem em amor e oração.

A **CAPES** pela bolsa de estudos, que foi importante para dedicação exclusiva à pesquisa.

Aos **animais do biotério**, o meu respeito porque deram suas vidas a pesquisa.

Por fim, agradeço a **todos** que de alguma forma ajudaram para realização deste trabalho. **Agradecida!**

Não que possamos reivindicar qualquer coisa baseado em nossos próprios méritos, mas nossa capacidade vem de Deus.

II Coríntios 3:5

Resumo

O extrato aquoso da casca de *Bellucia dichotoma* (EaBd) é utilizado tradicionalmente em casos de acidentes ofídicos e tem se mostrado como promissor contra o envenenamento por *Bothrops atrox* (VBa). O soro antibotrópico (SAB) é a terapia convencional após o acidente com *B. atrox*. Há evidências da ação bloqueadora local de EaBd em camundongos envenenados, contudo faltam estudos da ação sistêmica dessa planta contra VBa. A associação entre EaBd e SAB também poderia ser uma alternativa para o acidentado. O baço é o sítio responsável pela filtração, resposta imune do sangue, como também local da hematopoiese extramedular. No presente estudo, camundongos Swiss foram desafiados com o veneno botrópico e tratados com *Bellucia dichotoma*, utilizando a mesma concentração do extrato e condições de preparo da população nativa, a fim de investigar a ação do veneno e o possível efeito antiofídico do EaBd no período de 24 h. Assim, cinco tratamentos experimentais (n=4) foram estabelecidos: salina, (veneno de *Bothrops atrox*) VBa, VBa/EaBd, VBa/EaBd/SAB (soro antibotrópico) e VBa/SAB. Após o período experimental, os animais foram sacrificados e os baços removidos e fixados em formalina tamponada para posterior processamento em resina histológica. Cada órgão foi serialmente seccionado (9-12 seções/órgão) que permitiram a determinação do volume total do baço e de sua microestrutura segundo as modernas técnicas estereológicas. O veneno de *B. atrox* reduziu o volume da região eritropoiética da polpa vermelha e o volume da bainha linfoide periarteriolar (PALS), região rica em linfócitos T da polpa branca. Além disso, a população de macrófagos foliculares esteve significativamente aumentada no grupo VBa em relação aos demais grupos. O tratamento EaBd e EaBd/SAB não apresentaram alterações significativas, com exceção do componente cápsula que esteve aumentado em EaBd/SAB. Os tratamentos envolvendo o extrato também mostraram-se similares aos tratamentos salina e SAB. Em conclusão, o extrato aquoso de *B. dichotoma* administrado por via oral logo após o envenenamento por *B. atrox* é efetivo na inibição das alterações morfológicas quantitativas no baço de camundongos envenenado quando avaliados após 24 horas.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*, *Bellucia dichotoma*, estereologia, histologia, baço.

Abstract

Aqueous extract from *Bellucia dichotoma* bark (EaBd) has traditionally been used in cases of snakes-bites accidents and has been shown to be promising against *Bothrops atrox* (VBa) poisoning. Antibothropic serum (SAB) is the conventional therapy after the accident with *B. atrox*. There is evidence of the local blocking action of EaBd in poisoned mice, however studies of the systemic action of this plant against VBa are lacking. The association between EaBd and SAB could also be an alternative for the injured. The spleen is the site responsible for filtration, immune response of the blood, as well as site of extramedullary hematopoiesis. In the present study, Swiss mice were challenged with bothropic venom and treated with *Bellucia dichotoma*, using the same extract concentration and native population preparation conditions, in order to investigate the action of venom and the possible antiofidic effect of EaBd in the period of 24 h. Thus, five experimental treatments (n = 4) were established: saline, VBa (*Bothrops atrox* venom), EaBd, EaBd/SAB and SAB. After the experimental period, the animals were sacrificed and the spleens removed and fixed in buffered formalin for further processing in histological resin. Each organ was serially sectioned (9-12 sections/organ) that allowed the determination of the total volume of the spleen and its microstructure according to modern stereological techniques. *B. atrox* venom reduced the volume of the erythropoietic region of the red pulp and the volume of the periarteriolar lymphoid sheath (PALS), a region rich in T lymphocytes of the white pulp. In addition, the population of follicular macrophages was significantly increased in the VBa group in relation to the other groups. The treatment EaBd and EaBd/SAB did not present significant changes, except for the capsule component that was increased in EaBd/SAB. The treatments involving the extract were also similar to saline and SAB treatments. In conclusion, the aqueous extract of *B. dichotoma* administered orally shortly after *B. atrox* poisoning is effective in inhibiting the quantitative morphological changes in the spleen of mice poisoned when evaluated after 24 hours.

Keywords: *Bothrops atrox*, *Bellucia dichotoma*, stereology, histology, spleen.

Lista de Abreviaturas

CLECL	Lectina do Tipo C
DME	Dose Mínima Edematogênica
EABd	Extrato Aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i>
FLONA	Floresta Nacional do Tapajós
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LAO	L-aminoácidos Oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALS	Bainha Linfoide Periarteriolar
PLA₂	Fosfolipases A ₂
SAB	Soro Antibotrópico
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SOZ	Partículas Zymosan Opsonizada
SVSP	Serinoproteases
UEPA	Universidade do Estado do Pará
VBa	Veneno de <i>Bothrops atrox</i>
WHO	World Health Organization

Lista de Figuras

Ordem	Título	Página
1	Acidentes ofídicos no Estado do Amazonas	16
2	Serpente <i>Bothrops atrox</i> coletada na Floresta Nacional do Tapajós	18
3	Aspecto geral de <i>Bellucia dichotoma</i>	23
4	Camundongo dissecado revelando a relação topológica entre o baço	32
5	Diagrama do baço visto em menor aumento	34
6	Diagrama de região do baço sobreposta com um sistema de contagem contendo uma moldura (<i>frame</i>) de dimensões definidas	36
7	Efeito dos tratamentos sobre a biometria dos animais	38
8	Efeito dos tratamentos sobre o volume do baço por meio do Princípio de Cavalieri e deslocamento de fluido (Scherle)	39
9	Apresenta a distribuição do volume dos componentes da polpa vermelha em valores absolutos relacionados ao volume total do baço	41
10	Disposição do volume dos componentes da polpa branca em valores absolutos	42
11	Ordenamento do volume dos componentes presentes no baço em valores absolutos e contagem em 2D dos megacariócitos	43
12	Contagem celular em 2D nas polpas vermelha e branca	44
13	A relação entre os volumes das polpas (vermelha e branca) e volume total do baço no quadrante 3D.	45
14	Histologia do baço dos animais experimentais	46
15	Precisão e eficiência da análise estereológica no baço.	48

Lista de Tabela

Ordem	Título	Página
1	Ação e efeitos fisiológicos do envenenamento pelo gênero <i>Bothrops</i> .	19

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos	16
2.2. Características da serpente <i>Bothrops atrox</i>	18
2.3. Acidente Botrópico: veneno e sintomas	19
2.4. Tratamento Convencional	20
2.5. Uso do Tratamento Alternativo	22
2.6. <i>Bellucia dichotoma</i> (Metastomataceae)	23
2.7. Morfologia esplênica associada ao envenenamento e posterior tratamento alternativo	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. HIPÓTESES DESTE ESTUDO	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. Objetivo Geral	28
5.2. Objetivos Específicos	29
6. MATERIAL e MÉTODOS	29
6.1. Material vegetal	29
6.1.1. Coleta e identificação da espécie vegetal	29
6.1.2. Obtenção do extrato aquoso de <i>Bellucia dichotoma</i> (EABd)	29
6.2. Material animal	30
6.2.1 Aquisição do veneno de <i>Bothrops atrox</i> (VBa) e do soro antibotrópico (SAB)	30
6.3. Animais experimentais	30
6.4. Indução do envenenamento por <i>Bothrops atrox</i>	31
6.5.1 Coleta, processamento e volumetria dos órgãos	31
6.5.2. Estereologia	33
6.5.3. Determinação do volume (Cavalieri)	34
6.5.4. Determinação do volume relativo (Delesse)	36
6.5.5. Contagem do número de perfis celulares	37
6.6. Estatística	38
7. RESULTADOS	39
7.1. Biometria dos animais	39
7.2. Volume total do baço	40
7.3. Componentes esplênicos	42
7.3.1. Volume da polpa vermelha e seus componentes	42
7.3.2. Volume da polpa branca e seus componentes	42

7.3.3 Volume das trabéculas e cápsula esplênicas	44
7.4. Contagem Celular	45
7.5. Histologia do baço	48
7.5. Eficiência da técnica estereológica	48
8. DISCUSSÃO	50
9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	56

1. INTRODUÇÃO

Acidentes causados por animais peçonhentos são um problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2009, acidentes ofídicos foram inclusos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas, estimando que no mundo anualmente 1.841.000 pessoas são envenenadas resultando em 94.000 óbitos (WHO, 2014). No Brasil estima-se uma média de 26.000 casos de ofidismo por ano, dos quais 0,39% causam morte e 1,72% deixam sequelas nos acidentados. A região Norte do país apresenta a maior incidência de casos por 100.000 habitantes no qual o Estado do Amazonas é o segundo Estado com maior número de casos de Ofidismo. Desses acidentes, quando é identificado o gênero, grande parte é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2014, 2016). A maioria dos acidentes ocorridos na região Amazônica é atribuída à espécie *Bothrops atrox*, denominada popularmente como Jararaca do Norte, Jararaca do rabo branco, Surucucurana e Jipoboia (CARDOSO, J. L. C. et al., 2009; WALDEZ; VOGT, 2009).

O veneno de *Bothrops atrox*, assim como de outras serpentes *Bothrops*, produz efeitos sistêmicos e locais como, extensa hemorragia, mionecrose, edema, coagulação anormal do sangue, insuficiência renal, formação de bolhas e a necrose, o que pode levar à perda do membro afetado (CARDOSO, J. L. C. et al., 2009). Um estudo de relato de caso verificou que aproximadamente 24 horas após um acidente ofídico ocorrido num equino de um mês, associado ao gênero *Bothrops*, o baço apresentou alterações histopatológicas como congestão, hemorragia acentuada e necrose. Essas alterações relatadas são importantes para caracterização clínica de órgãos como baço, pouco estudados no caso de envenenamento por *Bothrops* (RAPOSO et al., 2000).

As plantas medicinais antiofídicas são amplamente utilizadas ao redor do mundo e servem como um complemento ou alternativa para o tratamento nos acidentes ofídicos, principalmente quando o acesso à soroterapia é limitado (AMBIKABOTHY et al., 2011). As diversas plantas, já conhecidas no uso para acidentes ofídicos vêm sendo estudadas cientificamente e mostram o seu poder no tratamento contra venenos ofídicos (SAJON et al., 2017). A população dos municípios da Amazônia brasileira é atingida por essa realidade

do difícil acesso ao tratamento convencional, devido à sua distância aos postos de saúde e a precária locomoção. Em virtude da rica flora amazônica e dos conhecimentos do povo nativo, a população local busca utilizar principalmente os extratos de plantas da região como forma de tratamento (MOURA; MOURÃO, 2012). A flora e suas diversas espécies de vegetais encontradas na Amazônia são recomendadas no tratamento de vítimas que sofreram acidentes ofídicos, no entanto, a maioria dessas plantas nunca foi estudada cientificamente para avaliar suas ações e autenticar as formas de manejo utilizadas tradicionalmente (MOURA et al., 2015).

Bellucia dichotoma Cogn. é uma espécie endêmica da região Amazônica, encontrada nos Estados: Acre, Amazonas, Amapá e Pará no Norte do Brasil, conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta. (BAUMGRATZ, 2013). O chá da casca de *B. dichotoma* é utilizada para fins medicinais na cidade de Santarém, Oeste do Pará, principalmente como prevenção e para tratar vítimas por picadas de serpentes. A população usa a casca no preparo do chá antes de entrarem na mata, como forma preventiva e nas vítimas após os acidentes ofídicos. A *B. dichotoma* tem como as principais classes de metabólitos, os quais foram encontrados: ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos hidrolisáveis e condensados no extrato aquoso da casca (MOURA et al., 2013).

A atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* após utilizar protocolo de pré-incubação com o extrato de *Bellucia dichotoma* (veneno: extrato) alcançou a inibição de 100% dessa atividade, devido à presença de compostos químicos capazes de neutralizar as metaloproteases, tais compostos como taninos e flavonóides (ou sinergismo entre eles) que podem atuar com íons quelantes de zinco e impedir o funcionamento das enzimas metaloproteases (MOURA et al., 2013). Foi analisada a capacidade do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* em inibir atividade hemorrágica e edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, o qual mostrou inibição completa na hemorragia quando pré-incubada e eficaz efeito no bloqueio da atividade edematogênica quando administrado de acordo com uso tradicional e teve efeito adicional na inibição ao ser tratado em combinação com soro convencional (MOURA et al., 2014). Por outro lado, o pré-tratamento não obteve diferença significativa para as concentrações que foram testadas e no

grupo pós-tratamento a dose do extrato de *Bellucia dichotoma* 725 mg/kg foi capaz de inibir 40,5% da atividade hemorrágica de *Bothrops atrox* (MOURA et al., 2014).

Devido à realidade da população amazônica ao difícil acesso ao tratamento convencional e pelo conhecimento nativo sobre a rica flora e seu potencial, foram feitos estudos com a planta *Bellucia dichotoma* para comprovar seu poder antiofídico local, o qual mostrou ação contra o veneno. Este trabalho tem em vista somar conhecimento sobre o efeito do extrato oral de *Bellucia dichotoma* em baços envenenados e investigar o impacto causado pelo gênero *Bothrops atrox*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos

O Acidente Ofídico representa um sério problema de saúde pública no mundo, e está entre as vinte principais doenças tropicais negligenciadas prioritárias da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017). No Brasil anualmente em média 26.000 casos de Ofidismo, os quais 0,39% causam morte e 1,72% chegam à cura com sequelas. As ocorrências por picada de serpentes são reveladas através do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2016). O perfil epidemiológico das vítimas de acidentes ofídicos no Brasil mostra que 63% esta na faixa etária de 20 a 59 anos e de crianças e adolescentes está entre 10 a 19 anos. Nos indivíduos picados os membros inferiores são os locais anatômicos mais afetados. De forma geral, o grupo mais afetado é o do sexo masculino principalmente os que trabalham em locais rurais com letalidade de 0,45% (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BOCHNER et al., 2014).

Sabe-se que no Brasil existem peçonhas que pertencem às famílias *Elapidae* com o único gênero *Micrurus* dividido entre *Micrurus* e *Leptomicrurus* presente no Brasil, suas espécies são conhecidas corais e a outra família *Viperidae* que estão inseridos nos seguintes gêneros: *Crotalus* (cascavel, boicininga), *Lachesis* (surucuru, surucutinga) e as serpentes do grupo botrópico

que atualmente são divididas em dois gêneros, o *Bothrops* e o *Bothrocophias* (jararacas), onde gênero *Bothrops* tem como sinonímia *Bothropoides*, *Bothriopsis* e *Rhinocerophis* (CARRASCO et al., 2012). Envenenamento por serpente é responsável pelo maior número de óbitos em relação a animais peçonhentos no país (SINITOX, 2012). As picadas pelo gênero *Bothrops* são as mais comuns, cerca de 80% de todos os casos registrados (FEITOSA et al., 2015). A região Norte do país apresenta a maior incidência de casos / 100.000 habitantes no qual o Estado do Amazonas é o segundo Estado com maior número de casos de ofidismo. Desses acidentes quando é identificado o gênero, grande parte é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2014, 2016).

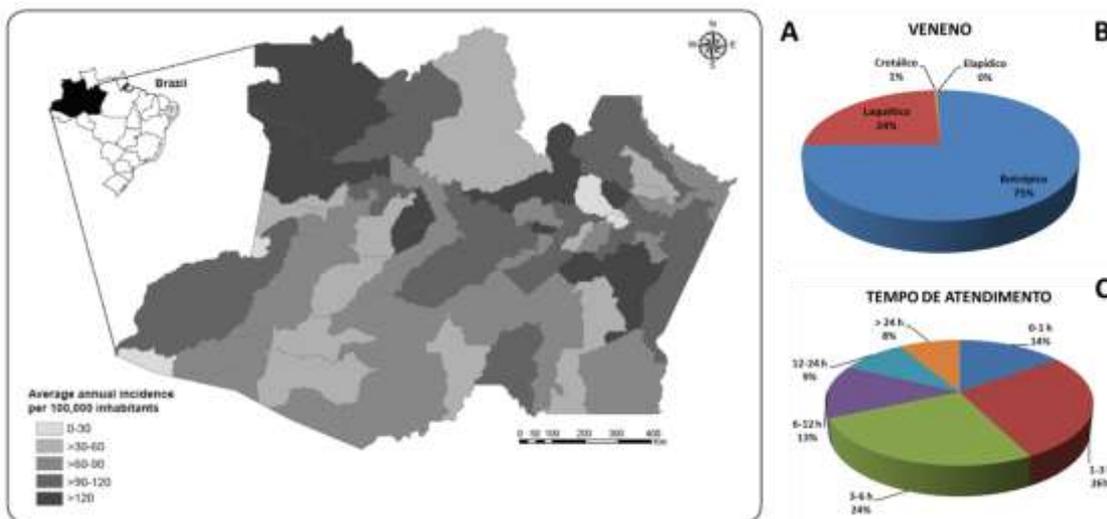


Figura 1. A. Incidência de acidentes por serpentes no Estado do Amazonas no período de 2007-2012. B. Identificação da serpente. C. Tempo decorrido até o atendimento médico. Fonte: Feitosa et al., 2015 (adaptado).

O Amazonas é o segundo maior estado em registros de acidentes ofídicos, com 17.745 casos e 117 óbitos entre os anos de 2000 a 2013, perdendo para o estado do Pará com 59.759 casos e 261 óbitos no mesmo período, de acordo com Ministério da Saúde (BRASIL, 2014). A maioria das informações sobre picadas de serpentes na Amazônia é baseada na vigilância de dados ou registros médicos hospitalares. Os acidentes ofídicos no Amazonas ocorrem predominantemente em homens adultos que moram nas áreas rurais ou estão envolvidos na agricultura, caça e atividades florestais. Além disso, o período de chuvas pesadas esta estritamente relacionada ao

aumento dos acidentes ofídicos (WALDEZ; VOGT, 2009; BERNARDE; GOMES, 2012; FEITOSA et al., 2015).

Além disso, na região Norte decorre a maioria das subnotificações dos acidentes ofídicos, em decorrência ao difícil acesso das comunidades nativas ao tratamento convencional (WALDEZ; VOGT, 2009; BOCHNER et al., 2014). Diante das dificuldades em locais isolados e ao transporte, a população amazônica recorre aos tratamentos alternativos, dentre as quais, a mais utilizada são as plantas medicinais (BORGES et al., 1999; OTERO, RAFAEL et al., 2000; CARDOSO, 2009).

2.2. Características da serpente *Bothrops atrox*

Bothrops atrox (Linnaeus, 1758) pertence à família *Viperidae*, sendo uma das espécies mais importantes para medicina, pois a maioria dos casos de acidentes ofídicos no Norte do Brasil é recorrente dessa serpente (CARDOSO, J. L. C. et al., 2009). Ela é conhecida pela população com os nomes de “surucucurana, jararaca-do-rabo-branco ou jararaca do norte”, caracterizada pela cauda sem maiores modificações com escamas subcaudais em pares, presença de fosseta loreal entre o olho e narina e com dentição do tipo solenóglifa. Possui mais de uma cor, variando de acordo com a região onde vive e não apresenta chocalho em sua cauda (CAMPBELL et al., 2004; MELGAREJO, 2009). É uma serpente ágil, que pode superar 1,5 m de comprimento (WARRELL, 2004) (Figura 2). Sua habitação é em locais rurais e na periferia de grandes cidades, com preferência pelas áreas cultivadas, locais que há proliferação de roedores e ambientes úmidos como a mata, possuindo hábitos noturnos ou crepusculares (BRASIL, 2001; PINHO; PEREIRA, 2001).



Figura 2. Serpente *Bothrops atrox* coletada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA, km 83, Santarém, PA). Foto cedida por Hipócrates Chalkidis.

2.3. Acidente Botrópico: veneno e sintomas

O veneno de serpentes *Bothrops* é composto por diversas enzimas tóxicas e outras proteínas. As mais abundantes são fosfolipases A2 (PLA2), L-aminoácidos oxidase (LAAO), metaloproteinases (SVMP), Lectina do tipo C (CLECL) e serinoproteases (SVSP) as quais se destacam das demais. O seu veneno pode causar danos locais e sistêmicos nas vítimas (SOUSA et al., 2013; SOUSA et al., 2017).

Os efeitos locais afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele. Que resultam em sintomas como dor, edema, hemorragia e nos casos mais extremos a necrose. Nos acidentes botrópicos, a necrose muscular é uma consequência de extrema gravidade, que leva a perda permanente do tecido e a sua funcionalidade, que pode ocasionar muitas vezes, a amputação do membro atingido (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Envenenamento pela serpente *Bothrops atrox* induziu após 2 horas da injeção com veneno um halo hemorrágico marcado por trás dos camundongos, o qual foi confirmado pela quantificação da hemoglobina na pele (DE SOUZA et al., 2012).

Gênero	Ações do Veneno	Manifestações Locais	Manifestações Sistêmicas
<i>Bothrops</i>	Nefrotóxica Proteolítica local Hemorrágica	Edema intenso Equimose e bolhas Sangramentos Infecções	Hemorragia Coagulação Miotoxicidade Neurotoxicidade

Tabela 1. Ação e efeitos fisiológicos do envenenamento pelo gênero *Bothrops*.

Os efeitos sistêmicos podem ser observados quando há grande quantidade de veneno inoculado. As alterações ocorrem na homeostasia que leva ao prolongamento do tempo de coagulação e sangramento, levando a gengivorragia, hematêmese, hematúria e também incoagulabilidade sanguínea, em virtude do consumo de fibrinogênio endógeno, por componentes do veneno como a trombina-similes (KAMIGUTI et al., 1996).

De forma geral, ocorrem alterações na permeabilidade do vaso, mudança na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (HATI et al., 1999). Nas situações raras, os casos de insuficiência renal aguda e choque podem ser vistas. O choque pode estar provavelmente associado à quantidade de veneno introduzido na vítima (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). In vitro, veneno de *Bothrops atrox* mostrou uma alteração acentuada na determinação de PT (tempo de protrombina) e APTT (tempo de tromboplastina) o que indicou que vias extrínseca e intrínseca foram executadas com deficiência para os níveis séricos de fibrinogênio (DE SOUZA et al., 2012).

2.4. Tratamento Convencional

No Brasil, somente um tratamento é recomendado pelo Ministério da Saúde para acidentes ofídicos: administração endovenosa de soro antiofídico de acordo com a gravidade do envenenamento. Para a fabricação desses imunobiológicos, há quatro centros responsáveis, Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (IBU, São Paulo, SP), Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG) e Centro de Produção de Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI, Piraquara, PR).

Os animais imunizados produzem anticorpos que neutralizam as toxinas do veneno, então classificados como monovalentes ou/e polivalente, seguindo o número de gêneros de serpentes, de quem os venenos foram empregados na imunização (CARDOSO, D. F. et al., 2009). O cavalo continua sendo o animal de escolha para a produção de antiveneno, mas outros animais vêm sendo utilizados também com o intuito de diminuir as reações desfavoráveis em pacientes, devido à exposição ao soro de cavalo (WEN, 2009).

Os principais soros antiofídicos para neutralizar os venenos são direcionados para as seguintes serpentes: antielapídico (*Micrurus sp*), antilaquétrico (*Lachesis sp*), anticrotálico (*Crotalus sp*), antibotrópico (*Bothrops sp*), antibotrópicoláquetico (*Bothrops sp* e *Lachesis sp*) e o antibotrópico-crotálico (*Bothrops sp* e *Crotalus sp*). A soroterapia reverte com eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito. Porém, ela apresenta algumas desvantagens, que são: ineficiência no combate dos efeitos locais do veneno (aumento das chances de deixar sequelas no membro atingido e evolução para complicações raras), sucessão de efeitos colaterais (incluindo reação anafilática e hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro), e ainda a necessidade de cuidados com estoque do soro e prazo de validade (CARDOSO, D. F. et al., 2009).

Ademais, mostrou-se que esses soros têm capacidades diferentes para neutralizar venenos (DA SILVA et al., 2007). Estudos ainda indicam que os antivenenos convencionais não são efetivos contra o veneno de *Bothrops atrox* como também para as outras espécies deste gênero (DA SILVA et al., 2003; FITA et al., 2010). Para finalizar, existem dificuldades na disponibilização do soro para algumas regiões do país, pois os serviços de saúde equipados permanecem restritos às regiões de maior desenvolvimento socioeconômico, no caso as capitais e centros urbanos. Assim, para os locais de intensa distância geográfica e difícil acesso, como exemplo na Região Norte, as populações dessas localidades buscam tratamentos alternativos naturais, que atuam de forma a complementar ou inclusive a ser o único recurso na falta do soroterápico específico (BORGES et al., 1999; DOS-SANTOS, 2009).

2.5. Uso do Tratamento Tradicional Complementar

As plantas medicinais ainda são um meio muito utilizado contra o envenenamento por serpentes na medicina popular ao redor do mundo (AMBIKABOTHY et al., 2011). Visto que a distribuição geográfica florestal brasileira é grande, principalmente na região Norte do país e que devido às dificuldades encontradas no acesso ao tratamento realizado pelo atendimento de saúde, as comunidades são obrigadas a buscar terapias alternativas, geralmente o campo da fitoterapia (CARDOSO, 2009). Estudos mostram que as plantas são usadas na medicina popular para tratar picadas de serpente, acreditando que suas propriedades antiofídicas podem ser um tipo de complemento de soro terapia ou como uma alternativa de tratamento quando o antiveneno não é disponível (OTERO, R et al., 2000; MOURA et al., 2015). Surgiram evidências científicas do conhecimento tradicional sobre as propriedades antiofídicas destes extratos. Contudo, apenas na década de 70, o tema mereceu devida atenção nos meio científico (MARTZ, 1992).

Os extratos vegetais podem conter diversos componentes químicos, como flavonoides, triterpenos, alcaloides, taninos, ligninas, que possuem a capacidade de inibir o veneno de serpentes, sendo atuantes diretos na inibição enzimática ou inativadores químicos, os quais interagem diretamente com macromoléculas alvo (MORS et al., 2000). Extratos e seus compostos isolados demonstraram capacidade de bloqueio na presença de atividades biológicas induzidas por venenos de serpentes (OLIVEIRA et al., 2005; MOURA et al., 2015). Outro aspecto do uso fitoterápico como antiveneno é a avaliação citotóxica dos extratos sobre os órgãos-chave dos processos fisiológicos. Estudos vêm buscando plantas contra os venenos de serpentes e nos quais apresentam alterações morfológicas ou não no coração, fígado, rins e baço (FUNG et al., 2009; MARTINES et al., 2014; VENKATESAN et al., 2014). Assim tornando relevante tal investigação associada ao efeito antiofídico de fitoterápicos.

2.6. *Bellucia dichotoma* (Metastomataceae)

Bellucia dichotoma pertence à família Melastomataceae, que constitui cerca de 4.570 espécies, pertencendo a 166 gêneros, com distribuição pantropical com aproximadamente 3.000 espécies no neotrópico (CLAUSING; RENNEN, 2001). No Brasil, existe por volta de 68 gêneros (ROMERO; MARTINS, 2002), as quais no presente momento são conhecidas cerca de 2.950 espécies assim se tornando a sexta maior família de Angiospermas, distribuindo-se desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul. Logo, 19 estão presentes em praticamente todos os tipos de vegetação, com um número variável de espécies (RENNEN, 1994). A *B. dichotoma* é uma espécie endêmica da região Amazônica, denominado popularmente como muúba ou goiaba-de-anta. A casca dessa planta é utilizada para finalidade medicinal na cidade de Santarém, Oeste do Pará, principalmente para tratar vítimas por picadas por serpentes (MOURA et al., 2013).

Do gênero *Bellucia* sp., as espécies *Bellucia grossularioides* e *Bellucia pentamera* já possuem estudo fitoquímico no qual concluíram que apesar de *B. grossularioides* e *B. pentamera* pertencerem ao mesmo gênero, elas apresentaram distinções concebíveis quanto à composição química. A forma da espécie *B. grossularioides* é rica em compostos de média polaridade, enquanto a espécie *B. pentamera* apresenta como composto predominante o esqualeno (ISAZA et al., 2007). Para a espécie *B. dichotoma*, relatou-se as principais classes de metabólitos desta espécie, os quais foram detectados ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos hidrolisáveis e condensados no extrato aquoso da casca (MOURA et al., 2013).

De acordo com os trabalhos de (MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2015), o extrato aquoso da casca de *B. dichotoma*, testado contra os efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox*, possui eminente bloqueio, o qual apresentou 100% de inibição frente às ações hemorrágicas, fosfolipásicas, edematogênicas e coagulantes. E mais, quando o extrato aquoso usado por via oral foi testado em camundongos foi capaz de reduzir o edema da pata de maneira significativa nos primeiros 30 minutos em todas as doses analisadas. Em 6 horas de tratamento, a inibição chegou ao seu nível máximo e foi ainda maior quando o extrato (via oral) e soro

antibotrópico foram administrados simultaneamente, por conseguinte esse tratamento se mostrou mais eficaz em comparação ao preconizado pelo Ministério da Saúde (MOURA et al., 2014). Esses resultados nos mostram o quanto é importante estudar a planta *Bellucia dichotoma* contra o veneno de *Bothrops atrox*, pois se tornou um alvo promissor na busca de uma terapia alternativa antiveneno.

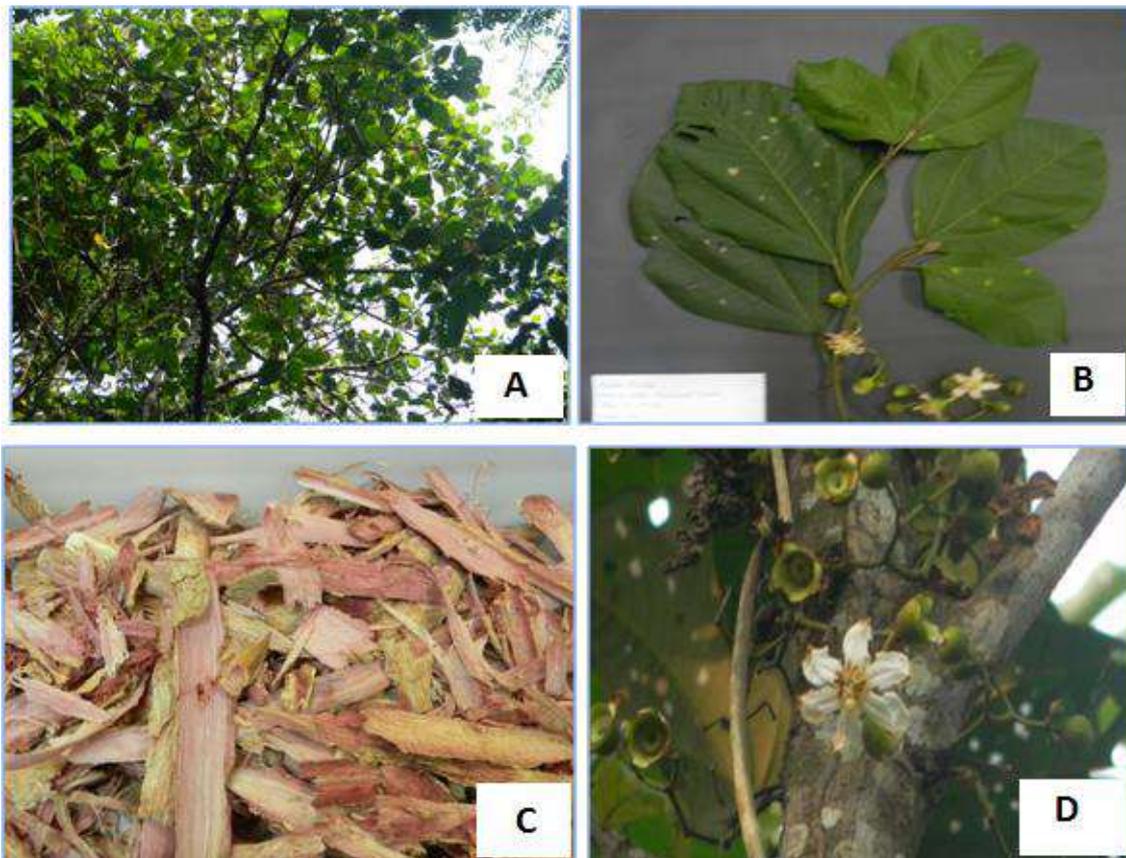


Figura 3. Aspecto geral de *Bellucia dichotoma* Cogn. A) Árvore; B) Folhas; C) Casca; D) Flores. Fotos de Valéria Mourão.

2.7. Morfologia esplênica associada ao envenenamento e posterior tratamento alternativo

O baço é o órgão linfóide secundário responsável pela vigilância imunológica e pela filtração do sangue. O baço é ricamente vascularizado, com parênquima dividido em duas polpas: branca e vermelha. A polpa vermelha é o local de filtração do sangue oriundo da corrente sanguínea, o qual é

responsável por remover eritrócitos senescentes, danificados e antígenos. Conhecida por ser o sítio do metabolismo do ferro, armazenamento de eritrócitos e de plaquetas para eventual necessidade (CESTA, 2006). Nela encontramos uma malha tridimensional de cordões esplênicos constituídos de fibras reticulares, células reticulares e macrófagos associados e seios venosos. Dentro dos espaços entre os cordões encontramos eritrócitos, granulócitos e células circulantes mononucleares. Incluindo também os linfócitos, células hematopoiéticas e plasmócitos que, após a diferenciação ao reconhecer antígenos, migram dos folículos e da bainha linfoide periarteriolar (PALS) (MEBIUS; KRAAL, 2005). Os macrófagos da região da polpa vermelha são ativamente fagocíticos, pois promovem a remoção de eritrócitos senescentes e danificados e partículas em suspensão vindas do sangue. Na polpa vermelha é comum ocorrer a hematopoiese extramedular em roedores no estágio fetal e neonatal (MATSUNO et al., 1989; MEBIUS; KRAAL, 2005) ou em condições de estresse/doença ou gravidez (BRONTE; PITTET, 2013). Na polpa vermelha são encontrados os seios venosos que ficam adjacentes à zona marginal, revestidos por uma rede de células endoteliais e fibras reticulares (SAITO et al., 1988). Vários pigmentos podem ser encontrados no baço, sendo a hemossiderina no citoplasma de macrófagos os achados mais típicos, de fato é o pigmento mais comum da polpa vermelha. O ferro da hemoglobina dos eritrócitos fagocitados é convertido em hemosiderina para armazenamento no baço (LOSCO, 1992).

A polpa branca é encarregada de iniciar as respostas imunes aos antígenos do sangue, pois contém um quarto dos linfócitos do corpo e possui também outras células fagocíticas importantes (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) na resposta imunológica. A polpa branca é composta por três subcompartimentos: bainha linfoide periarteriolar (PALS), folículos e zona marginal (CESTA, 2006). Fora esses, encontramos as arteríolas centrais e os capilares. A PALS são formadas por linfócitos, bases homocêntricas de fibras e células reticulares divididas em PALS internos e externos (SAITO et al., 1988; VAN REES et al., 1996). A região interna com alta concentração de linfócitos T, possui uma coloração mais intensa que a região externa, pois sua população é predominantemente de células T pequenas. As células TCD4⁺ é a linhagem mais abundante na PALS interna, mas podemos encontrar em menor número

células TCD8⁺ como também as células dendríticas interdigitadoras e células B migratórias (SAITO et al., 1988; DIJKSTRA; VEERMAN, 1990; VAN REES et al., 1996; STEINIGER, 2015). A PALS externa é um importante sítio de tráfego de linfócitos, no qual ocorre o desenvolvimento de plasmócitos. Os linfócitos que preenchem essa área têm características de tamanho médio e pequeno (MATSUNO et al., 1989; DIJKSTRA; VEERMAN, 1990). Após os PALS, a área de folículos surge. Encontrados nos locais de bifurcação das arteríolas centrais, são formados principalmente por linfócitos B e em menor número por células dendríticas foliculares e células TCD4⁺, geralmente não possuem células TCD8⁺ (VAN REES et al., 1996; WARD et al., 1999). Os folículos podem conter centros germinativos, que são formados após células B serem estimuladas por antígenos, nele também contém macrófagos e células B apoptóticas (WARD et al., 1999). A zona marginal é achada exclusivamente no baço, situada entre a polpa vermelha, PALS e folículos. Tem como função rastrear antígenos e patógenos da circulação e efetua papel importante no processamento de antígenos (MEBIUS et al., 2004). No interior da zona marginal é formada a zona marginal metalofílico, que contém um subconjunto único de macrófagos que fica adjacente aos PALS e folículos (MATSUNO et al., 1989; DIJKSTRA; VEERMAN, 1990; MEBIUS et al., 2004). O seio marginal que é a zona adjacente à zona marginal dos macrófagos metalofílico é contínuo com os vasos que alimentam os leitos capilares das PALS e folículos (MEBIUS; KRAAL, 2005). Por fim, na estrutura da polpa branca, existe um anel externo espesso da zona marginal, composto de fibroblastos reticulares, macrófagos de zonas marginais, células dendríticas e células B de zona marginal (DIJKSTRA; VEERMAN, 1990; MEBIUS; KRAAL, 2005). Os macrófagos da zona marginal são essenciais na remoção de microrganismos e vírus, devido expressar uma série de receptores de reconhecimento de padrões, sendo muito importantes na absorção de várias bactérias (MEBIUS; KRAAL, 2005). Além das polpas, o baço apresenta trabéculas que surgem da cápsula contendo vários vasos sanguíneos, linfáticos e nervos no seu interior. Os vasos linfáticos são eferentes, nos quais os linfócitos migram para os linfonodos esplênicos (BALOGH et al., 2004; CESTA, 2006; BRONTE; PITTET, 2013).

O envenenamento por serpentes ao redor do mundo está envolvido em alteração sistêmica consideradas de grande risco à vida. Nesses casos os

órgãos mais estudados na literatura até o momento são os rins, fígado e coração, por serem sítios alvo das toxinas de venenos. Trabalhos mostram que os danos sistêmicos promovidos por envenenamento de serpentes provocam na sua maioria hemorragias, necrose, degeneração e outras alterações bioquímicas e hematológicas em modelo murino (RAPOSO et al., 2000; EVANGELISTA et al., 2010; SILVA et al., 2012; DE MORAIS et al., 2013). Quando se refere aos baços envenenados, a literatura denota poucos estudos sobre esse órgão. Contudo, o que se tem de envenenamento no baço mostram que as alterações mais marcantes nesse órgão são: congestão, hemorragia, hematopoiese extramedular e necrose nos casos mais graves (RAPOSO et al., 2000; SILVA et al., 2012; VENKATESAN et al., 2014). No entanto, existem estudos em murinos que quando envenenados por serpentes não sofreram alterações esplênicas (RODRIGUES et al., 2001; ZENI et al., 2007; GOPI et al., 2015). Isso pode estar diretamente relacionado ao tipo de serpente e ao tempo de envenenamento, pois quanto maior tempo de exposição do órgão ao veneno maior são os danos observados.

3. JUSTIFICATIVA

O número elevado de acidentes ofídicos que ocorrem na região Amazônica leva à busca pelo tratamento alternativo através de plantas medicinais que é uma opção rápida e barata para a população que não possui acesso em curto prazo ao tratamento. Dessa forma, esclarecer o efeito do veneno de *Bothrops atrox* no baço de mamíferos (modelo murino) e a ação do extrato da planta *Bellucia dichotoma* sobre o mesmo, vem contribuir para o conhecimento sobre o envenenamento no baço e os aspectos da toxicidade sistêmica dos fitoterápicos.

4. HIPÓTESES DESTE ESTUDO

Quanto ao veneno botrópico:

H₁: o envenenamento experimental por *B. atrox* altera a microestrutura esplênica.

H₀: o envenenamento experimental por *B. atrox* não altera a microestrutura esplênica.

Quanto ao tratamento fitoterápico não convencional ao envenenamento:

H₁: o extrato de *B. dichotoma* é eficiente na inibição dos efeitos do veneno de *B. atrox* na microestrutura esplênica.

H₀: o extrato de *B. dichotoma* não é eficiente na inibição dos efeitos do veneno de *B. atrox* na microestrutura esplênica.

Quanto ao tratamento fitoterápico não convencional ao envenenamento em associação ao soro antiofídico:

H₁: o extrato de *B. dichotoma*/soro antiofídico é eficiente na inibição dos efeitos do veneno de *B. atrox* na microestrutura esplênica.

H₀: o extrato de *B. dichotoma*/soro antiofídico não é eficiente na inibição dos efeitos do veneno de *B. atrox* na microestrutura esplênica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar por estereologia a macro e microestrutura do baço de camundongos Swiss desafiados com o veneno de *Bothrops atrox*, bem como, o papel do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* (*per si* ou em associação com o soro antibotrópico) na preservação desses componentes estruturais após 24 h experimentais.

5.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar as alterações volumétricas no baço;
2. Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a microestrutura esplênica envolvida com a filtração/hemodinâmica;
3. Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a microestrutura esplênica envolvida com a eritropoiese;
4. Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a microestrutura esplênica envolvida com o perfil celular imune;
5. Elucidar se o tratamento complementar (*Bellucia dichotoma*) apresenta equivalência em relação ao tratamento convencional (soro antibotrópico).
6. Avaliar a eficiência da estereologia na determinação do volume do baço.

6. MATERIAL e MÉTODOS

6.1. Material vegetal

6.1.1. Coleta e identificação da espécie vegetal

As amostras de *Bellucia dichotoma* foram coletadas no Estado do Pará, nas proximidades da comunidade de Cucurunã, Santarém, Pará, Brasil (02°27'21.0" S e 54°47'45.7" W), no mês de março de 2013. A identificação botânica foi feita pela Dra. Regina Célia Viana Martins da Silva do Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém/PA, Brasil). Uma exsicata da planta foi armazenada no Herbário sob o código (IAN): 1852213.

6.1.2. Obtenção do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* (EABd)

O extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* foi proveniente de Santarém/PA, o qual foi preparado de acordo com as práticas dos moradores locais do Eixo Forte da Região Oeste do Pará, Amazônia, Brasil (Moura et al.,

2014). Por conseguinte, utilizou o pó das cascas de *B. dichotoma* na quantidade de 50g, que foi extraído com água destilada na proporção 1:10 (m:v) com agitação constante de 1.250 rpm e temperatura de 100° C até ferver (chá por decocção). Após resfriamento, foi retirada a alíquota de 150 mL, proporcional a um copo de chá como utilizado pela população local. Posteriormente, o material foi liofilizado e o rendimento foi de 2,9 g de extrato seco.

6.2. Material animal

6.2.1 Aquisição do veneno de *Bothrops atrox* (VBa) e do soro antibotrópico (SAB)

O veneno foi obtido através de serpentes adultas da espécie *Bothrops atrox* oriunda da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), situada no km 83 da BR-163, em Santarém, PA, Brasil. Tanto a coleta como a extração do veneno foram consentidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ICMBio, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO - nº 14018). O veneno foi coletado *in natura*, em seguida liofilizado e mantido a -20° C até o momento do uso. Os animais foram mantidos no biotério das Faculdades Integradas do Tapajós/FIT, Santarém-PA, sob a responsabilidade do MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis e com a autorização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA nº 26/2013. Para o presente estudo, utilizou-se o soro antibotrópico (SAB) produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, com o seguinte número de Lote: 105113B.

6.3. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss do sexo masculino, pesando 34-41g, oriundos do Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil. Esses animais ficaram retidos em condições padrões

de temperatura $22 \pm 1^\circ \text{C}$, ciclo de 12 h claro/12 h escuro, acomodados em gaiolas - padrões com água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a regulamentação vigente (Lei Federal 11.794) e com a aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade do Estado do Pará (UEPA) com o Protocolo nº 43/11.

6.4. Indução do envenenamento por *Bothrops atrox*

Para a indução do envenenamento por *Bothrops atrox*, foram injetados 5 µg de veneno (que equivale a duas doses mínimas edematogênicas/DME) no coxim plantar das patas direitas posteriores dos camundongos em volume constante de 50 µL. Para avaliar o efeito do extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* no baço, foram utilizados os seguintes tratamentos:

- i. Salina, controle negativo (injeção de solução salina 0,9%, via subplantar);
- ii. Veneno de *Bothrops atrox* (VBa) (injeção de VBa 2x DME, via subplantar);
- iii. Extrato aquoso da casca de *B. dichotoma* (EaBd; 289,8mg/kg), via oral imediatamente após a injeção do veneno de *B. atrox*;
- iv. EaBd em associação ao soro antibotrópico (EaBd/SAB), via oral imediatamente após a injeção do veneno de *B. atrox* e SAB, via plexo venoso oftálmico (100 µL);
- v. Soro antibotrópico (SAB) (injeção de soro antibotrópico via plexo venoso oftálmico, 100 µL), após a injeção do veneno de *B. atrox*.

Nesse estudo foi utilizada a dose de EaBd de 289,8 mg/kg por ter sido esta a dose mais eficaz no bloqueio da atividade edematogênica provocada pelo veneno de *B. atrox* em camundongos (MOURA et al., 2014; MOURA et al., 2017).

6.5.1 Coleta, processamento e volumetria dos órgãos

Após 24 h de cada tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical e o baço removido por inteiro e fixado em formol tamponado por 48h (Figura 4A). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Morfologia Quantitativa, UFAM, Manaus, AM. Com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) os órgãos foram removidos de tecidos extraparenquimais e pesados em uma balança analítica (Shimadzu AY220, Japão).

Dois procedimentos foram adotados para a determinação do volume absoluto dos baços: (i) deslocamento de fluido, segundo SCHERLE (1970), (ii) seções seriais sistemáticas uniformes aleatórias segundo Cavalieri (HOWARD, V.; REED, M. G., 2010). Ambas as abordagens permitem a obtenção do volume absoluto, mas diferem quanto à precisão e acurácia dos resultados e quanto à praticidade de sua aplicação. Na primeira abordagem, os órgãos intactos foram individualmente submersos em um recipiente contendo a mesma solução fixadora suspensa por um fio delgado de cobre (Figura 4B). O órgão pendente na solução foi totalmente imerso, porém sem tocar o fundo e as laterais do recipiente. O conjunto foi disposto sobre uma balança analítica (Shimadzu AY220, Japão). Antes da imersão, a balança foi zerada e o valor observado no painel eletrônico após a imersão representou o volume do órgão sem correção da densidade do fluido (SCHERLE, 1970). Para a correção da densidade a seguinte equação foi aplicada: $Volume = \frac{PS}{DF}$, onde PS é o peso do órgão submerso (g) e DF é a densidade do fluido (1,060 g/cm³).

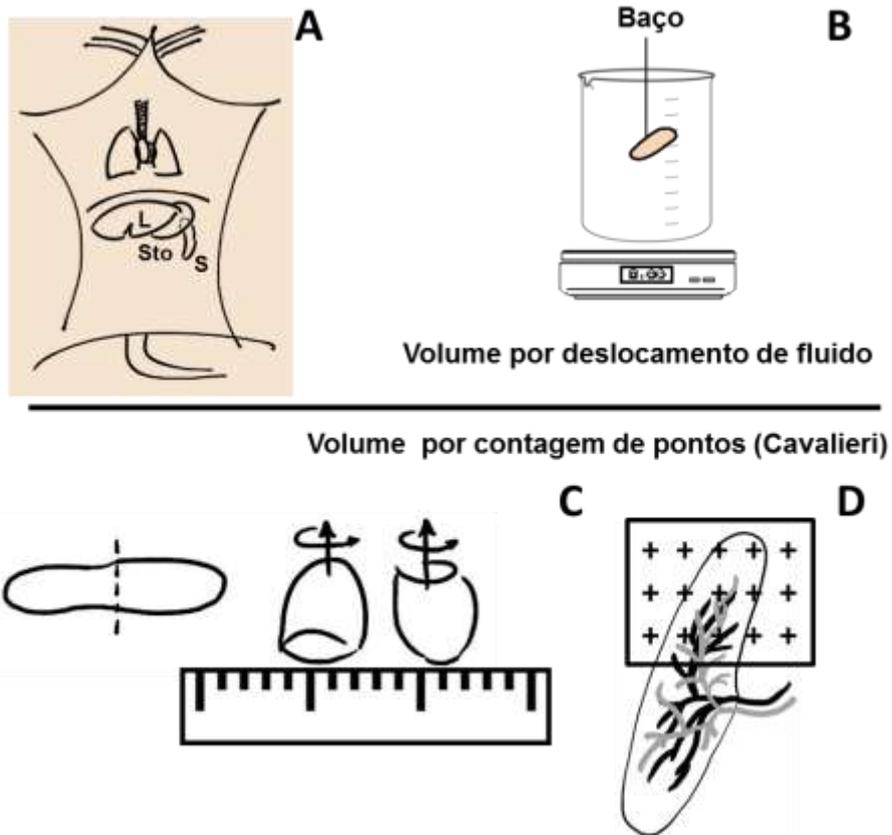


Figura 4. **A.** Camundongo dissecado revelando a relação topológica entre o baço (S), estômago (Sto) e fígado (L). **B.** Aplicação da técnica de deslocamento de fluido (volume) em balança analítica. **C.** Seccionamento do baço em duas metades, obtenção de orientação espacial aleatória pré-inclusão e microtomia. **D.** Aplicação do Princípio de Cavalieri por contagem de pontos sobre as seções seriais. A régua indica a posição em que as seções foram obtidas (9-13 por baço). O sistema de contagem contendo cruzes foi empregado para a obtenção do número total de pontos sobre o baço de cada animal.

6.5.2. Estereologia

Após a obtenção do volume por deslocamento de fluido, os baços foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), pré-infiltrados (96% etanol/resina plástica) e infiltrados (resina plástica). Em seguida, cada baço foi seccionado ao meio, e cada metade disposta com sua face seccionada voltada para o plano da mesa (plano horizontal) (Figura 4C). Cada metade foi girada em relação ao eixo vertical perpendicular ao plano horizontal seguindo um sistema de ângulos sorteados ao acaso. A posição aleatória obtida foi marcada no baço e mantida durante o processo de inclusão. Esse procedimento permite a obtenção de seções com elevada variabilidade na disposição dos perfis de estruturas garantindo redução no viés de

amostragem. As seções obtidas são chamadas de verticais (BADDELEY et al., 1986). As duas metades de cada baço foram dispostas em moldes individuais preenchidos finalmente com resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha). Os moldes foram mantidos em estufa aquecida a 40° C por 24 h para a polimerização completa da resina. Em seguida, cada bloco foi observado em um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e o comprimento total do baço incluído na resina foi medido e dividido por 9 ou 13, conforme o comprimento do órgão. O resultado obtido representou a distância entre as seções seriais a serem obtidas em cada órgão. Essa distância foi marcada em sequência ao longo do bloco de resina e serviu de orientação para a microtomia que foi realizada em um micrótomo (Leica RM 2145, Alemanha). As seções foram posteriormente coradas com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12 g; borato de Na⁺, 0,5 g; H₂O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5 g e H₂O destilada, 100 mL). Todos os procedimentos adotados para o processamento histológico estavam de acordo com KIERNAN (1999).

6.5.3. Determinação do volume (Cavalieri)

O princípio de Cavalieri (CAVALIERI, 1635) foi empregado para a determinação do volume total dos órgãos a partir de seções seriais. Esta técnica está fundamentada em robusta análise matemática e estatística e é extremamente eficiente (WEIBEL, 1980; GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD, C. V.; REED, M. G., 2010; MOUTON, 2011). Como proposto por Bonaventura Cavalieri há mais de 380 anos atrás, o volume de qualquer estrutura pode ser obtido após o seu seccionamento e determinação do produto das áreas planas obtidas pela distância entre as seções. Com a introdução dos sistemas de contagens, a sobreposição de pontos a estrutura de interesse passou a ser o referencial de contagem, isso dotou a quantificação com praticidade e eficiência (GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD, V.; REED, M. G., 2010).

O princípio de Cavalieri será empregado sempre que houver a necessidade da determinação precisa e acurada do volume. Para tal, as seções foram digitalizadas através de um estereomicroscópio com sistema de

captura de imagem (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e sobre cada seção foi sobreposto um sistema teste de contagem contendo pontos por meio do software *Imod* versão 4.7/módulo *stereology* (KREMER et al., 1996). A análise consiste em contar os pontos que tocam os respectivos órgãos como mostrado na Figura 4D. O somatório de pontos em cada órgão foi aplicado na seguinte equação:

$$V_{spleen} = \sum_{i=1}^m P_i \cdot \frac{a}{p} \cdot T$$

Onde, V é o volume absoluto do baço, $\sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre cada baço, a/p é a área representada por cada ponto ($44.100 \mu\text{m}^2$) e T ($1000 \mu\text{m}$) é a distancia entre cada seção. Um coeficiente de erro de 5% foi considerado aceitável. (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981; GUNDERSEN et al., 1988). Visto que as contagens nas seções seriais em um órgão representam eventos dependentes, não podemos aplicar as equações convencionais para a determinação das medidas de dispersão. Para tal, um conjunto de determinações estatísticas voltados para eventos dependentes foi aplicado (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981; MAYHEW, 1991; HOWARD, C. V.; REED, M. G., 2010).

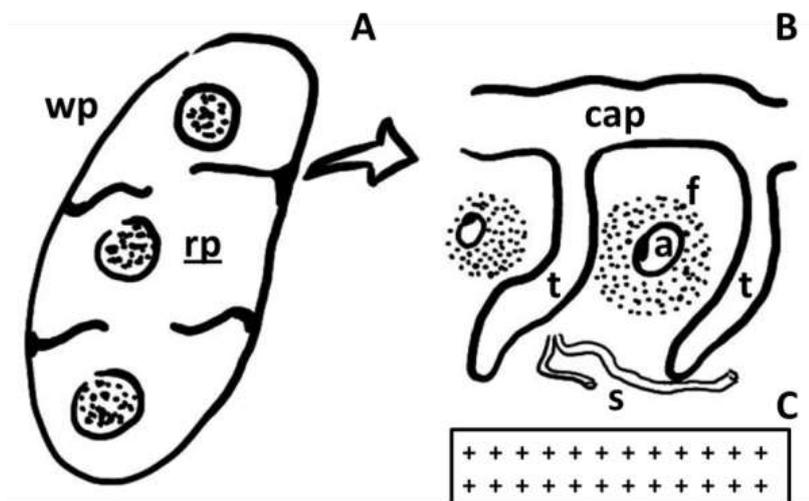


Figura 5. **A.** Diagrama do baço visto em menor aumento. **B.** Diagrama de área selecionada aleatoriamente e vista em maior aumento. **C.** Detalhe do sistema de contagem de pontos utilizado para a determinação da porcentagem de componentes no baço. cap, cápsula; t, trabécula; a, arteríola; f, folículo; s, sinusoides; wp, polpa branca; rp, polpa vermelha.

6.5.4. Determinação do volume relativo (Delesse)

A porcentagem de cada componente interno foi obtida pelo princípio de Delesse (densidade de volume) (HOWARD, C. V.; REED, M. G., 2010). Um aumento de 200x foi empregado em campos de vista selecionados aleatoriamente (Figura 5A). Os componentes foram quantificados pela contagem de pontos e referenciados em relação ao volume total do órgão (Figura 5B). A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (órgão) será calculado como:

$$Vv(\text{componente}, \text{espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde Vv é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa), P_{comp} é o somatório de pontos sobre os componentes do baço

(capsula; trabécula; polpa vermelha: região eritropoiética e sinusoides; polpa branca: bainha linfoide periarteriolar, folículo e zona marginal) e *Pref* é o somatório de pontos que tocam o espaço de referência (baço) (HOWARD, C. V.; REED, M. G., 2010) . Os valores percentuais foram transformados em absolutos após multiplicação pelo volume de Cavalieri.

6.5.5. Contagem do número de perfis celulares

Uma quantificação bidimensional foi empregada para a determinação do número de perfis de megacariócitos na polpa vermelha e linfócitos e macrófagos na polpa branca. Para tal, um sistema teste contendo quatro linhas delimitando uma moldura de contagem (*counting frame*) empregado (Figura 6^a e B). Os perfis foram contados somente se eles estivessem no interior da moldura (mesmo suas extensões) e não tocando a linha de exclusão. A seguinte equação foi empregada:

$$Q = \frac{\sum Q}{(\sum Nframes \times \sum Aframe)}$$

Onde: $\sum Q$ é o número de perfis celulares; $\sum Nframes$ é o somatório de molduras analisadas e $\sum Aframe$ é a área da moldura.

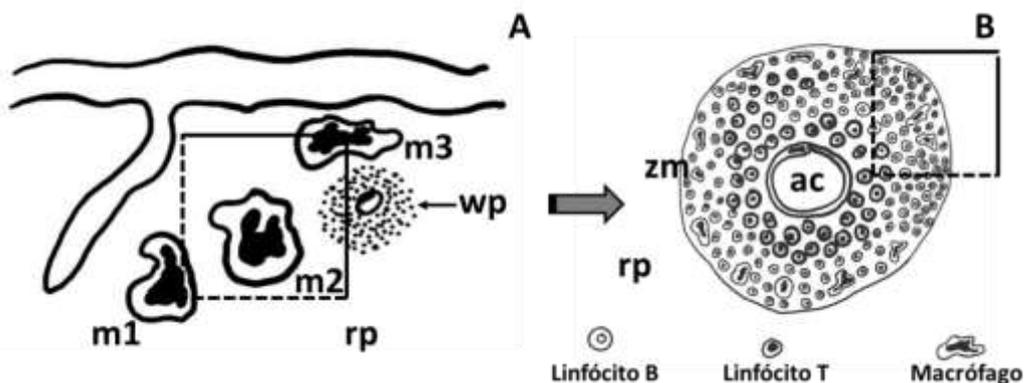


Figura 6. Diagrama da região do baço sobreposta com um sistema de contagem contendo uma moldura (*frame*) de dimensões definidas. A. Esse sistema foi usado para a contagem de perfis de megacariócitos (m1, m2 e m3). O sistema apresenta linhas contínuas (linha permitida) e tracejadas (linha de exclusão). Se o núcleo da célula em questão é visto dentro da moldura ou tocando a linha contínua, ele foi contado (ex. m2 e m3). Contudo, se o núcleo está fora da moldura ou toca a linha tracejada, este não foi contado (ex. m1). B. O mesmo procedimento foi empregado na contagem de linfócitos e macrófagos na região folicular. wp, polpa branca; rp, polpa vermelha; zm, zona marginal; ac, arteríola central.

6.6. Estatística

O programa estatístico Prisma (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA (análise de variância one-way). Nos casos em que a diferença entre os grupos seja indicada, o paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos testados. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%. Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz serão avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com (CRUZ-ORIVE, 1999):

$$CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right) = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)^{3/2}} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)$ indica o coeficiente de erro para a determinação do volume; $\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância das áreas transversais (*shape coefficient*) e depende da complexidade das formas da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^n Pi$ é o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da densidade de volume e de superfície foi estimado de acordo com (ORIVE, 1980) usando a equação:

$$CE(Rv) = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE(Rv)$ indica o coeficiente de erro para a determinação da relação superfície-volume ou densidade-volume; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções ou pontos efetuadas. Um $CE \leq 10\%$ será considerado satisfatório (preciso).

7. RESULTADOS

7.1. Biometria dos animais

A massa corporal, a massa dos baços e a relação massa do baço/massa corporal estão apresentados na Fig. 7. O aparente decréscimo na massa do baço (Fig. 7B) e na relação massa do baço/massa corporal (Fig. 7C) em VBa não apresentou diferença estatística.

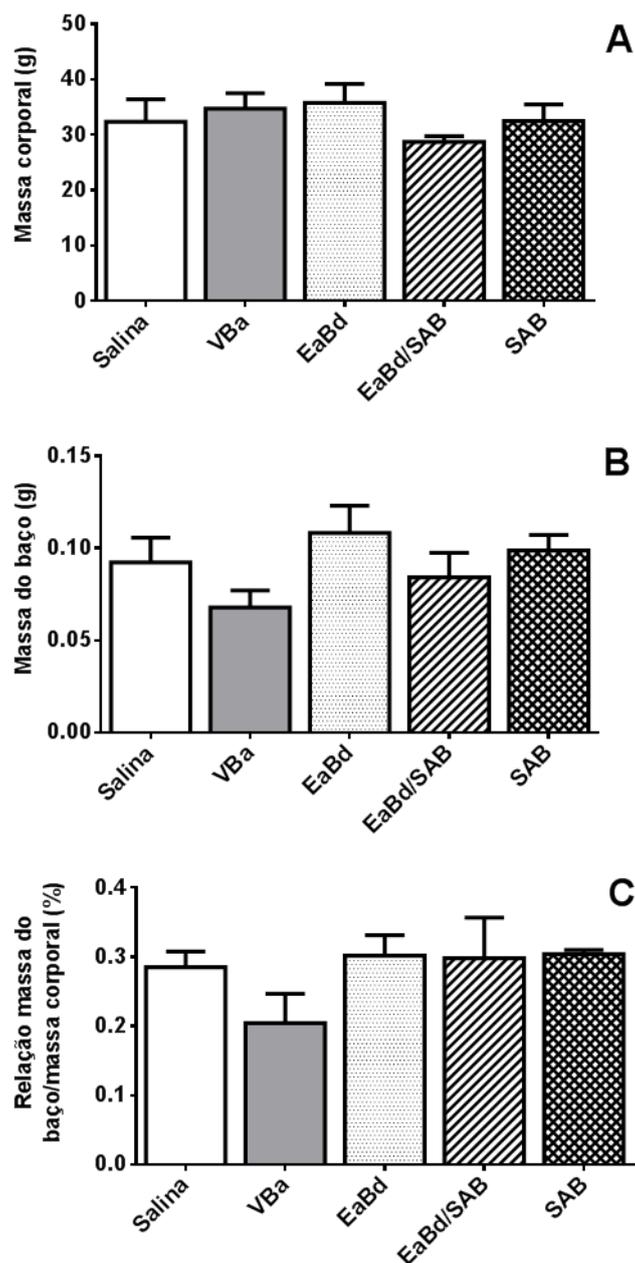


Figura 7. Efeito dos tratamentos sobre a biometria dos animais. A) massa corporal. B) massa dos baços. C) relação da massa baço/corpo dos animais. n=4 em todos os tratamentos. A diferença estatística, quando presente está indicada.

7.2. Volume total do baço

O volume total dos baços obtido por contagem de pontos (princípio de Cavalieri) e por deslocamento de fluido (segundo Scherle) está representado na Fig. 8A. Não houve diferença significativa nesse parâmetro nas duas

metodologias adotadas. O volume do baço esteve visualmente maior quando avaliado por deslocamento de fluido. Essa diferença pode estar relacionada à presença de tecidos extraesplênicos que aumentam o volume total do órgão. O volume total do baço relacionado à massa corpórea dos animais está apresentado na Figura 8B. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, contudo o grupo VBa, mais uma vez, mostrou tendência de decréscimo em relação aos demais.

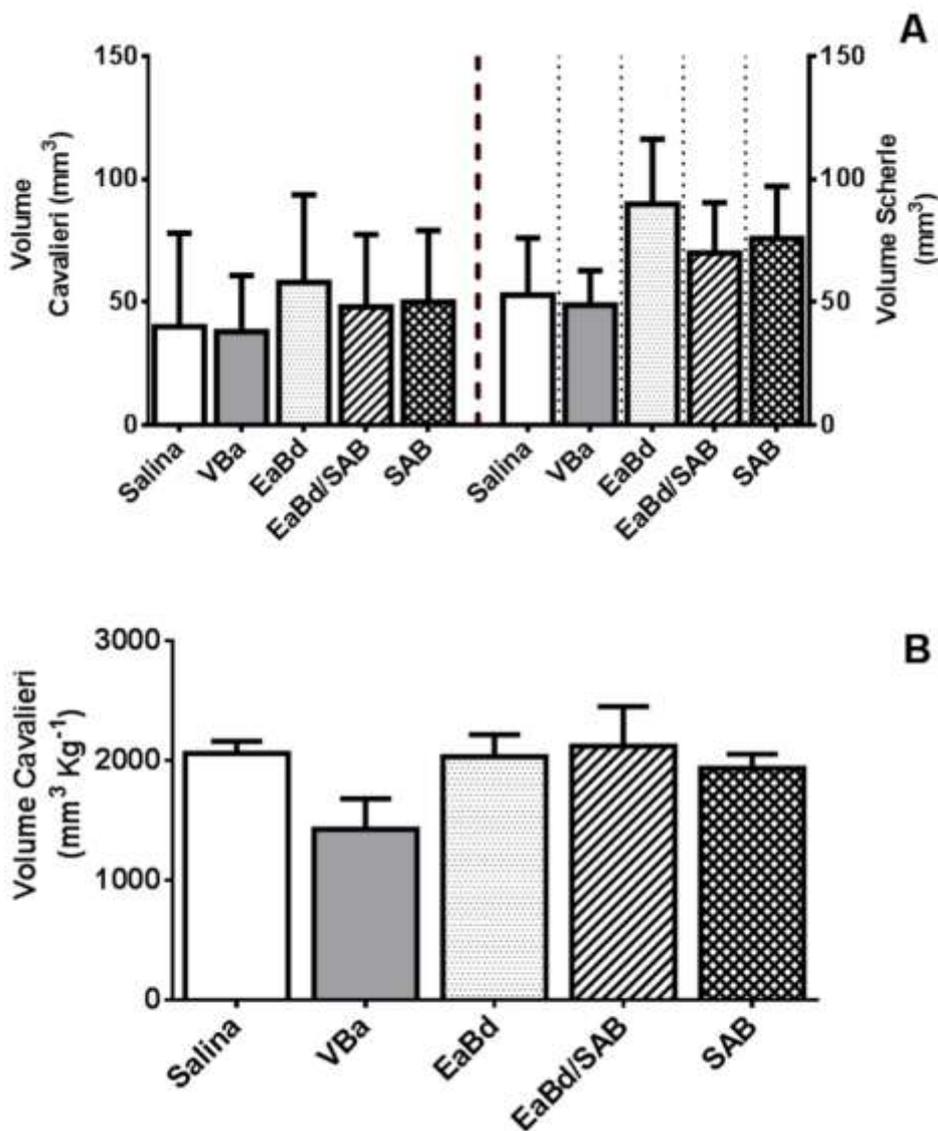


Figura 8. A. Efeito dos tratamentos sobre o volume do baço por meio do Princípio de Cavalieri e deslocamento de fluido (Scherle). B) Volume total do baço em função da massa corporal dos animais. n=4 em todos os tratamentos. A diferença estatística, quando presente está indicada.

7.3. Componentes esplênicos

7.3.1. Volume da polpa vermelha e seus componentes

O volume da polpa vermelha mostrou tendência de decréscimo no grupo VBa em comparação aos demais, que exibiram proximidade em seus valores (Fig. 9A). Tendência de decréscimo também foi observada para o volume da região eritropoiética (Fig. 9B) e volume dos sinusoides e cordões esplênicos (Fig. 9C). Contudo, não se observou diferença estatística entre os tratamentos. Como mencionado, o tratamento EaBd, EaBd/SAB e SAB foram semelhantes ao tratamento salina.

7.3.2. Volume da polpa branca e seus componentes

O volume da polpa branca mostrou tendência de decréscimo no grupo VBa em comparação aos demais, que exibiram proximidade em seus valores (Fig. 10A). O volume do PALS diminuiu significativamente no tratamento VBa em relação ao SAB ($p = 0,005$). Sugerindo mudanças na população de linfócitos T em volta da bainha periarteriolar. Os tratamentos salina, EaBd e EaBd/SAB apresentaram valores médios próximos. As regiões foliculares e a zona marginal não apresentaram alterações significativas. Sugerindo que a população de linfócitos B (foliculares) e residentes da zona marginal não foi alterada quantitativamente (Fig. 10C e D).

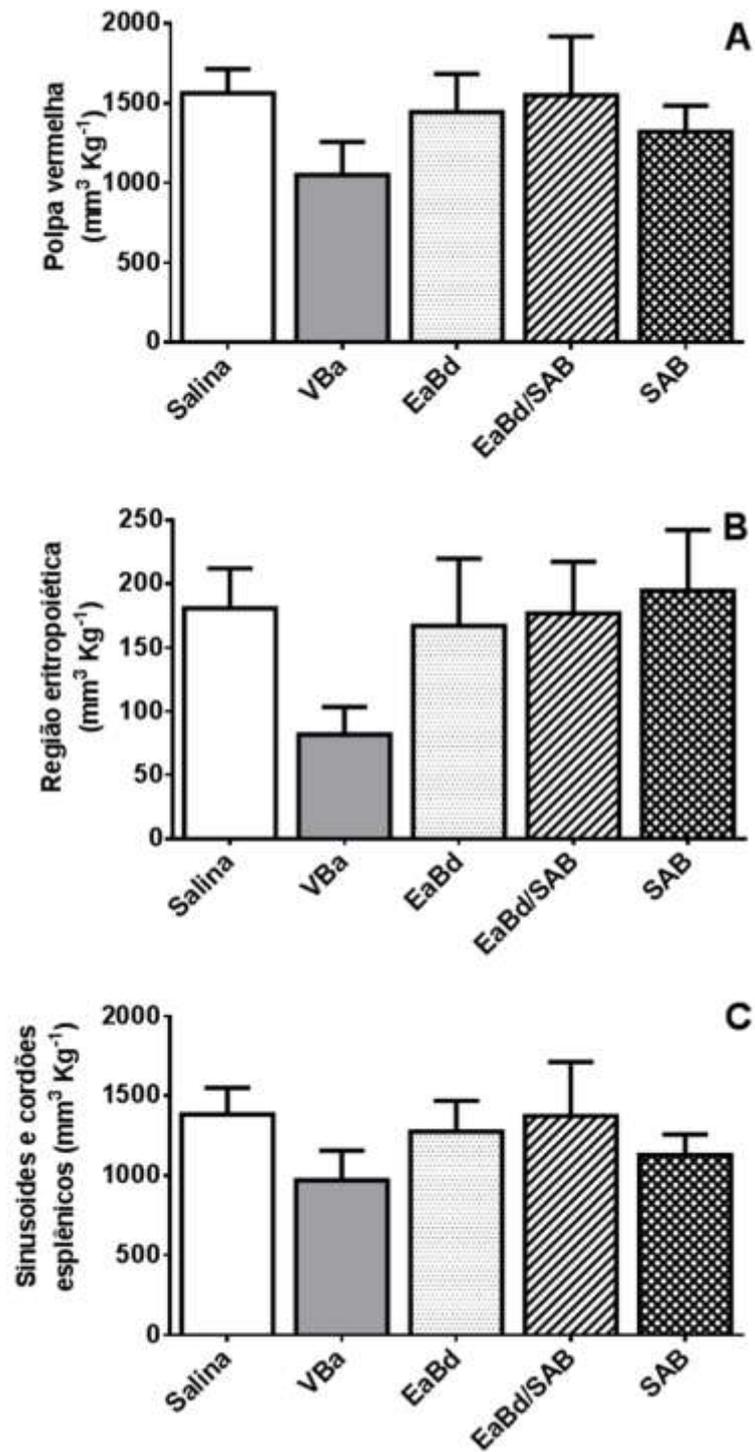


Figura 9. Quantificação da microestrutura da polpa vermelha. A) Volume da polpa vermelha. B) Volume da Região eritropoiética. C) Volume dos sinusoides e cordões esplênicos. n=4 em todos os tratamentos. A diferença estatística, quando presente está indicada.

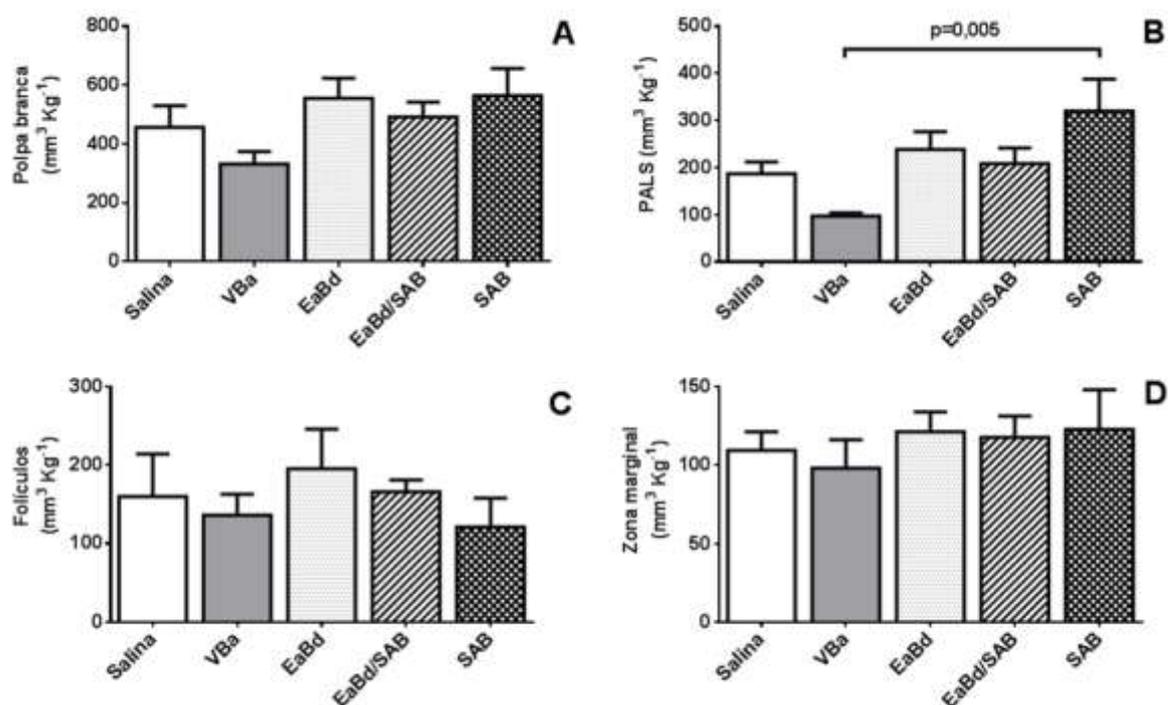


Figura 10. Quantificação da microestrutura da polpa branca. A) Volume total da polpa branca. B) Volume da Região PALS. C) Volume dos folículos. D) Volume da Zona Marginal. n=4 em todos os tratamentos. A diferença estatística, quando presente esta indicada.

7.3.3 Volume das trabéculas e cápsula esplênicas

Os componentes fibrosos (conjuntivo) que formam a cápsula e as trabéculas estão apresentados na Figura 11. Com exceção de uma tendência não significativa a aumento do volume das trabéculas nos tratamentos EaBd e EaBd/SAB, não observamos demais alterações nesse parâmetro (Fig. 11A). A cápsula esteve aumentada no tratamento EaBd/SAB em relação ao tratamento VBa, sugerindo indução de proliferação de componentes fibrosos ou células miocontráteis (Fig. 11B).

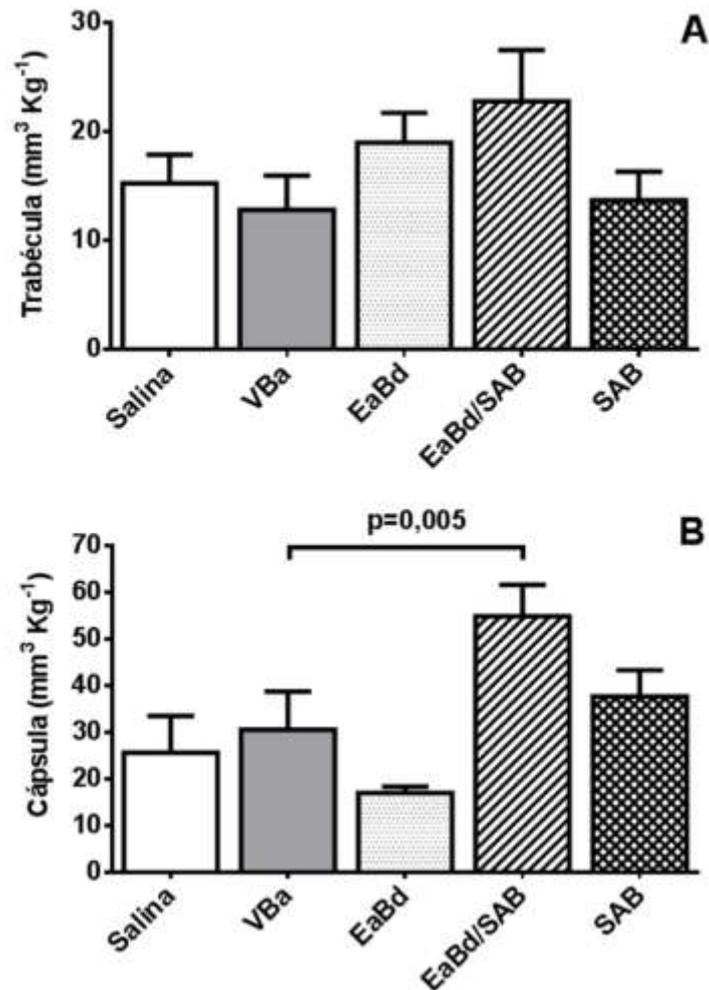


Figura 11. Quantificação da microestrutura dos componentes fibrosos. A) Trabécula. B) Cápsula. A diferença estatística, quando presente está indicada.

7.4. Contagem Celular

A Figura 12 apresenta as contagens de megacariócitos na polpa vermelha e de linfócitos e macrófagos foliculares na polpa branca. O número de megacariócitos e linfócitos não apresentou diferença estatística (Fig. 12A-B). Os número de macrófagos esteve significativamente aumentado no tratamento VBa, sugerindo aumento na fagocitose.

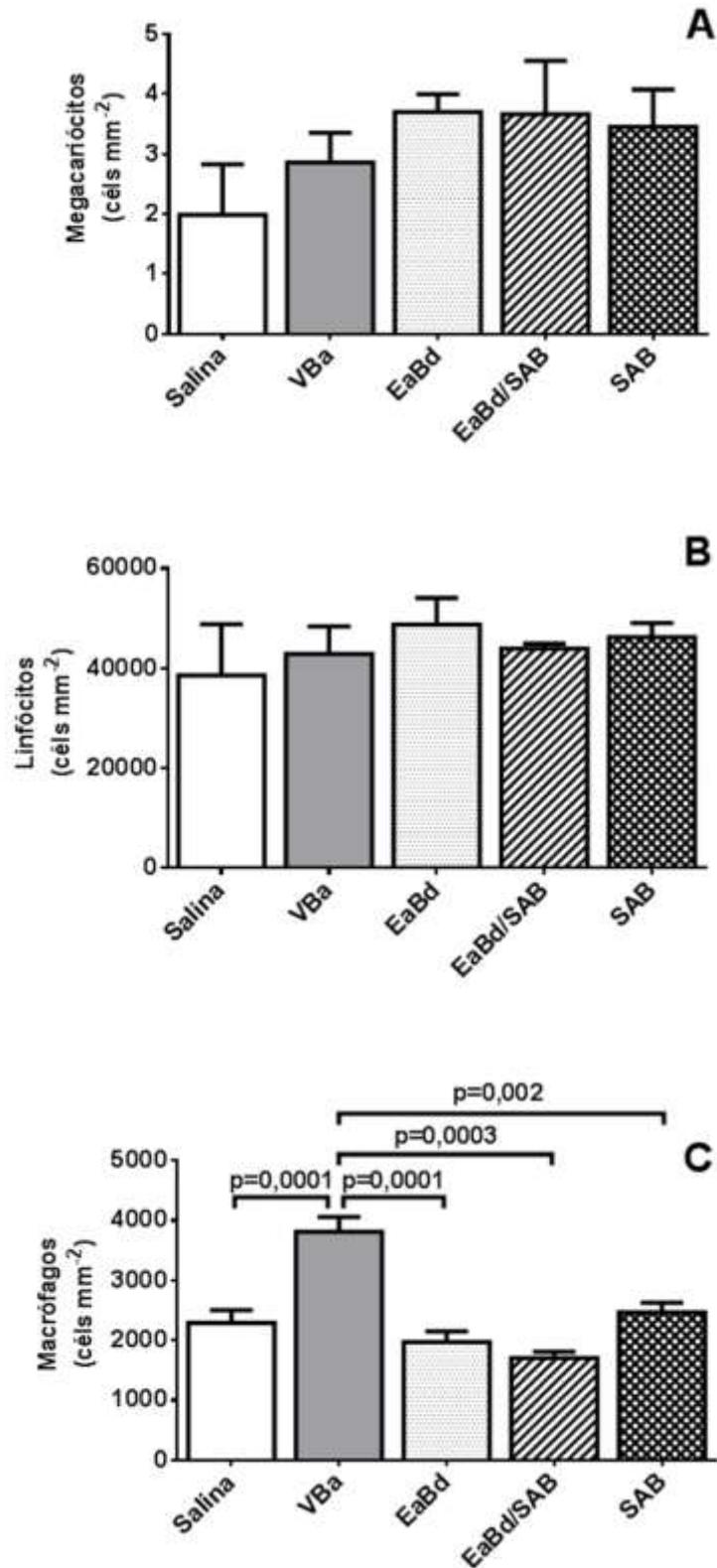


Figura 12. Contagem do número de células em 2D. A) Número de megacariócitos. B) Número de linfócitos foliculares. C) Número de macrófagos foliculares.

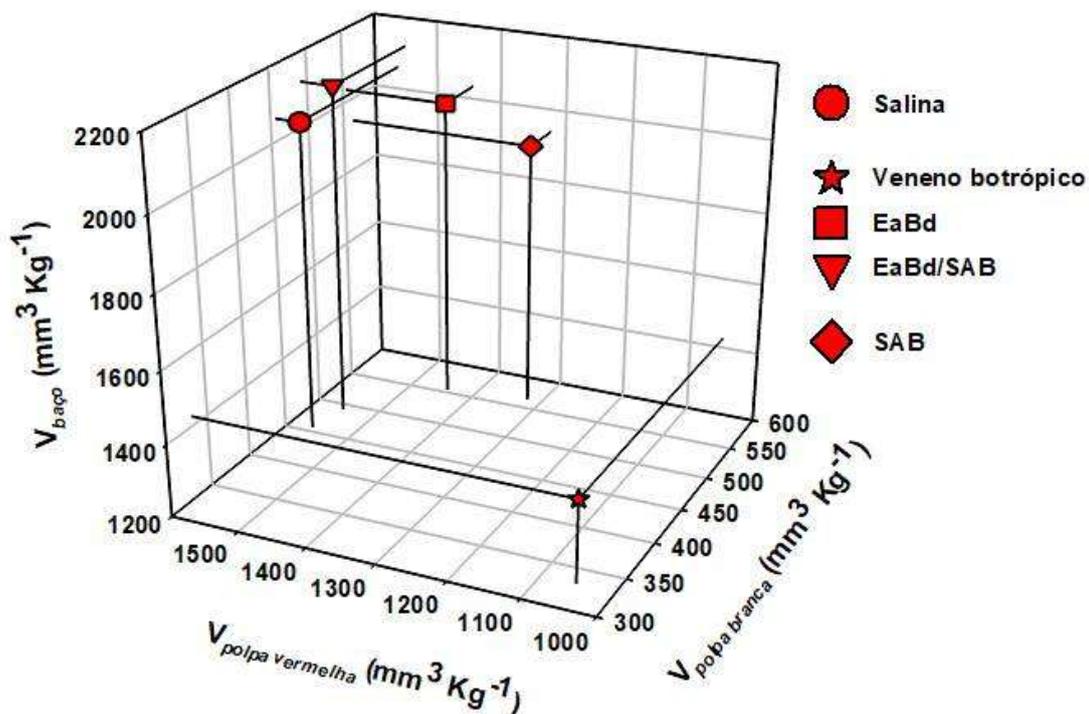


Figura 13. Relação entre o volume da polpa branca, polpa vermelha e volume total do baço. o tratamento VBa foi caracterizado por menor volume da polpa branca e vermelha resultando em menor volume do baço. Os demais grupos mostraram certa aglomeração.

A Figura 13 apresenta a interação entre os componentes do baço e sua relação com o volume total do órgão. Nesta interpretação é possível observar a distancia relativa entre o tratamento VBa e os demais. Esse tratamento foi caracterizado por menor volume da polpa branca e vermelha resultando em menor volume do baço. Os tratamentos salina, EaBd, EaBd/SAB e SAB apresentaram proporções similares. Esses resultados sugerem que o extrato de *Bellucia dichotoma* apresenta um efeito bloqueador ás atividades tóxicas do veneno de *B. atrox*.

7.5. Histologia do baço

A histologia do baço dos animais nos tratamentos experimentais está apresentada na Figura 14. A análise microscópica mostrou aparente redução do PALS e da região eritropoiética em VBa (dados comprovados após a análise estereológica).

7.5. Eficiência da técnica estereológica

A Figura 15 apresenta a influência do número de seções sobre a precisão da determinação do volume de Cavalieri do baço. O volume do baço nos diferentes tratamentos começa a estabilizar a partir de 12 seções histológicas ao longo do órgão todo. Contudo, um coeficiente de erro abaixo de 5% já pode ser observado com 6 seções. Esses resultados indicam que a eficiência e a precisão neste estudo são alcançadas com 12 seções histológicas. Menos é imprecisa, mais é ineficiente.

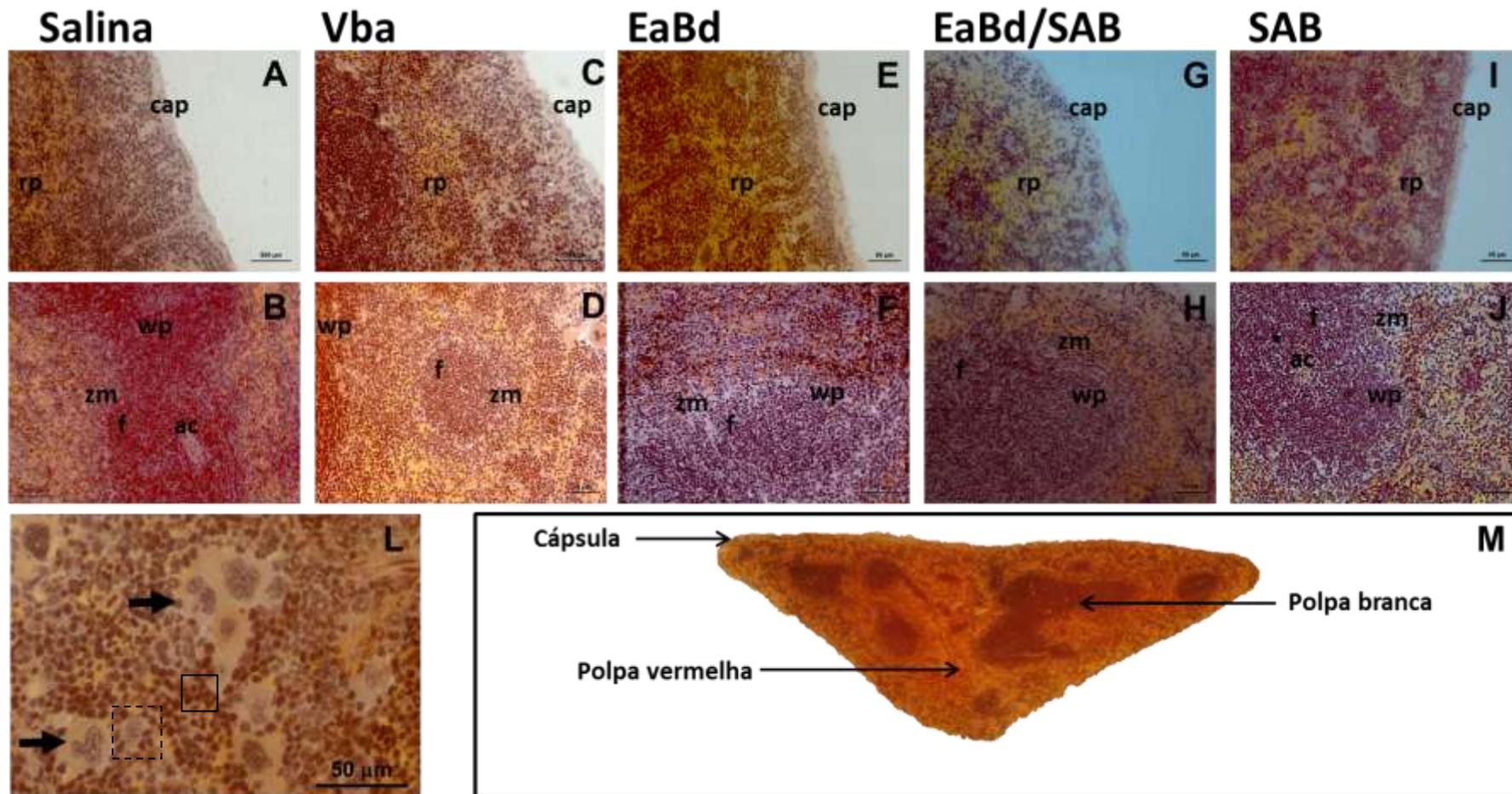
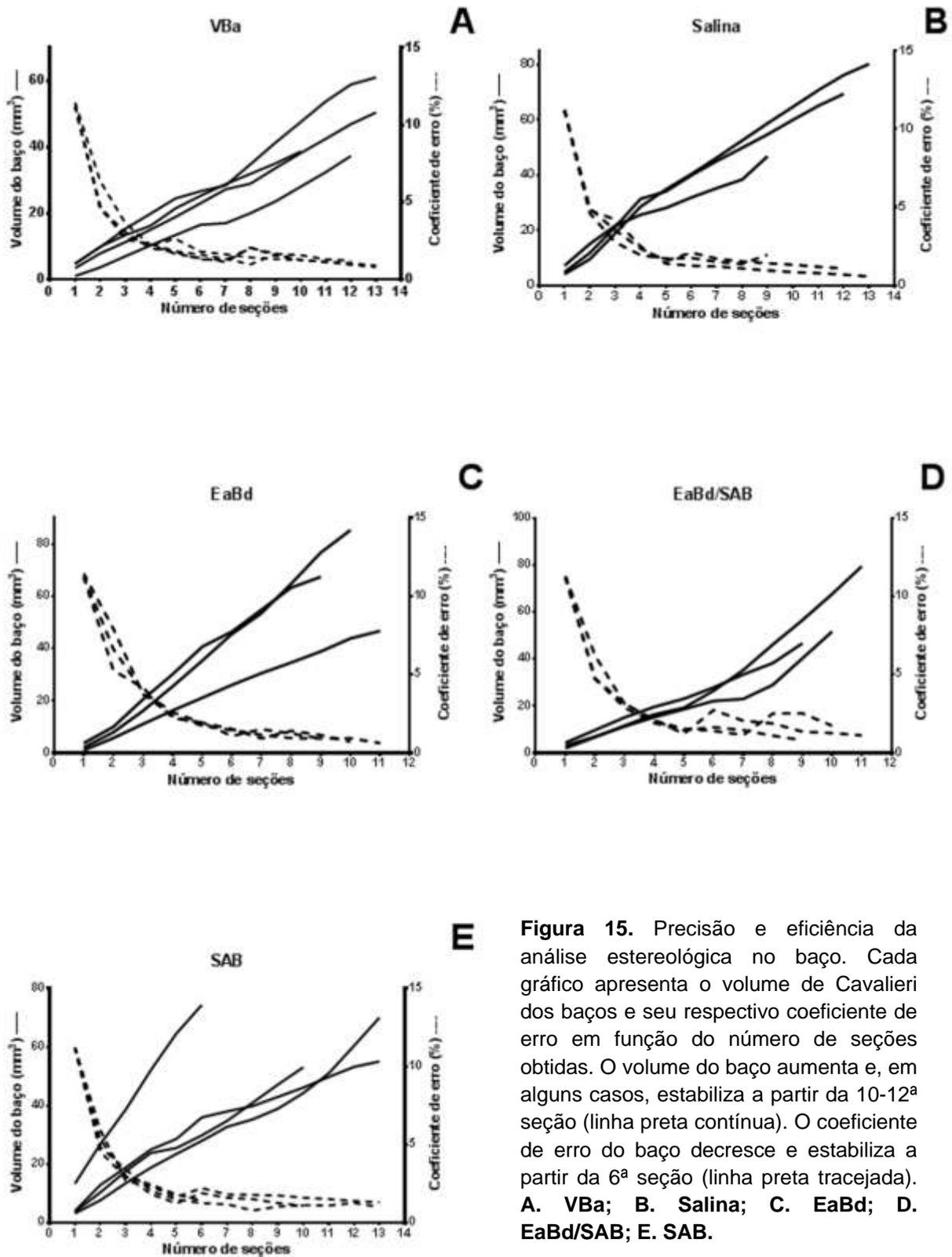


Figura 14. Histologia do baço dos animais experimentais. A-B) Salina; C-D) Veneno botrópico; E-F) Extrato de *Bellucia dichotoma*; G-H) Extrato de *Bellucia dichotoma*/soro antibotrópico; I-J) soro antibotrópico. L) Região da polpa vermelha infiltrada com megacariócitos (setas), macrófagos (quadrado tracejado) e linfócitos (quadrado contínuo). M) Seção de baço indicando as macroestruturas visíveis nesse aumento. cap, cápsula; t, trabécula; ac, arteríola central; f, folículo; wp, polpa branca; rp, polpa vermelha; zm, zona marginal.



E **Figura 15.** Precisão e eficiência da análise estereológica no baço. Cada gráfico apresenta o volume de Cavalieri dos baços e seu respectivo coeficiente de erro em função do número de seções obtidas. O volume do baço aumenta e, em alguns casos, estabiliza a partir da 10-12ª seção (linha preta contínua). O coeficiente de erro do baço decresce e estabiliza a partir da 6ª seção (linha preta tracejada). **A.** VBa; **B.** Salina; **C.** EaBd; **D.** EaBd/SAB; **E.** SAB.

8. DISCUSSÃO

Os extratos vegetais possuem a capacidade de inibir as ações do veneno de serpentes através de componentes químicos que bloqueiam a atividade enzimática, atuam como quelantes, inativam processos químicos ou agem como imunomoduladores de macromoléculas alvo (MORS et al., 2000). *Bellucia dichotoma* é utilizada na medicina popular contra o envenenamento por serpentes na região Norte do Brasil. O extrato aquoso dessa planta possui ação antiedematogênica contra o veneno de *B. atrox* (MOURA et al., 2014). No presente estudo, foram realizados experimentos no baço de camundongos envenenados por *Bothrops atrox* e tratados com a planta *Bellucia dichotoma*, utilizando a mesma concentração do extrato e condições de preparo da população nativa, a fim de investigar a ação do veneno e os possíveis efeitos do extrato aquoso sobre o baço envenenado.

Neste estudo, a ação aguda (24 h) do veneno de *B. atrox* afetou a morfologia da polpa vermelha, reduzindo o volume da região eritropoiética, e comprometeu a polpa branca, reduzindo o volume de PALS e aumentando o número de macrófagos. Esses dados são uma indicação de alterações na produção de eritrócitos e na resposta imune. O extrato de *B. dichotoma* inibe os efeitos do veneno botrópico, preservando as microestruturas esplênicas e provavelmente sua função. A associação entre o extrato de *B. dichotoma* e o soro antibotrópico apresentou os mesmos efeitos de proteção esplênica. Os danos histopatológicos no baço foram insignificantes, contudo as mínimas alterações quantitativas foram reveladas pela estereologia, comprovando que essa ferramenta apresenta elevado nível de acurácia e precisão.

Estudos mostraram que danos no baço envenenados por serpentes (RAPOSO et al., 2000; SILVA et al., 2012; VENKATESAN et al., 2014) causam hemorragia, a congestão, a autofagia, a esplenomegalia e, raramente, a necrose do baço. A polpa vermelha é o sítio de filtração do sangue, no qual há eliminação de células senescentes e danificadas, metabolismo do ferro e armazenamento de megacariócitos e eritrócitos (CESTA, 2006). Em nosso estudo, a região eritropoiética da polpa vermelha quando utilizado VBa apresentou decréscimo, embora não significativo, isso possivelmente pode estar associado com os mais abundantes componentes do veneno que

exercem efeito hemolítico, as metaloproteinases e serinoproteases (GUTIÉRREZ, 2002). Essas proteínas são responsáveis pelo grave quadro hemorrágico característico dos envenenamentos (FREITAS DE SOUSA et al., 2015). Associado a isso também há o efeito anticoagulante causado pelo consumo do fibrinogênio endógeno que exacerba o quadro hemorrágico (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ, 2002). Ainda, muitos venenos de serpentes contêm componentes que podem destruir os eritrócitos e leucócitos por hemólise, uma condição conhecida por anemia hemolítica microangiopática (BARTHOLD et al., 2016). Essa condição é um efeito secundário da coagulopatia induzida pelos componentes do veneno. Como o veneno estimula a formação de coágulos, feixes de fibrinogênio e proteínas coaguladas formam-se nos vasos e facilitam a destruição de eritrócitos que são capturados nessas malhas (BARTHOLD et al., 2016).

Durante a coleta dos órgãos de nosso estudo, não verificamos um quadro hemorrágico externo nos animais em 24 h, porém, a análise posterior das patas que receberam o veneno revelou elevada porcentagem de hemorragia (dados não publicados), o que indica a ação dessas proteases na coagulopatia, citotoxicidade (especialmente as fosfolipases) e degradação dos componentes da matriz extracelular dos vasos promovendo extravasamento de células do sangue para os tecidos adjacentes. Sob tais circunstâncias é comum um quadro de esplenomegalia (como mencionado anteriormente) com aumento da polpa vermelha como uma indicação de aumentada hematopoiese extramedular e filtração de antígenos (SILVA et al., 2012). Nossos resultados estão em oposição a este cenário possivelmente devido ao aspecto agudo de nossa análise. Essas observações sugerem que os danos no baço são progressivos a partir da inoculação do veneno e que nas primeiras 24 h pós-acidente as alterações morfológicas são menos severas. Contudo, os estudos não são unânimes quanto aos danos agudos causados por serpentes. No estudo de MORENO; GUTIÉRREZ (1988), os baços de camundongos envenenados nas primeiras 24 horas pela espécie *Bothrops asper* também não apresentaram alteração histológica significativa na polpa vermelha. Enquanto que as alterações encontradas no baço equino envenenado pelo gênero *Bothrops sp* (> 24 h) foram mais severas, consistindo de congestão e hemorragia (RAPOSO et al., 2000).

Uma população celular esplênica diversa não somente capturam e removem antígenos do sangue, mas também iniciam respostas imunes inatas e adaptativas. Essas respostas são desempenhadas na polpa branca do baço. Essa população inclui os leucócitos, várias linhagens de linfócitos T e B, células dendríticas e macrófagos (BRONTE; PITTET, 2013). Essas últimas estão envolvidas na identificação de patógenos, na remoção de células senescentes e antígenos, regulam a homeostase tecidual e as respostas inflamatórias e moldam a imunidade adaptativa (CESTA, 2006; ELMORE, 2006). Em nosso estudo, o VBa induziu a aumento dos macrófagos foliculares, provavelmente envolvidos na fagocitose dos compostos tóxicos do veneno e restos celulares resultantes da morte celular. Interessante salientar que, teoricamente, o aumento na população de macrófagos induz a aumento da eritropoiese (BRONTE; PITTET, 2013). É provável, que esse evento seja progressivamente importante com o tempo. Até recentemente, os macrófagos residentes dos tecidos eram vistos como descendentes dos monócitos circulantes; contudo, os estudos de mapeamento genético sugerem que muitos macrófagos e monócitos representam distintas linhagens de fagócitos (SCHULZ et al., 2012). Enquanto que os monócitos circulantes derivam das células tronco hematopoiéticas, muitos macrófagos residentes (pulmão, fígado, cérebro, cavidade peritoneal, medula óssea e baço) são estabelecidos em seu local antes do nascimento a partir de elementos presentes no saco vitelínico ou a partir de precursores embrionários do fígado (SCHULZ et al., 2012). Isso implica dizer que o aumento dos macrófagos em nosso estudo pode ter uma origem medular ou local. Segundo (AZNAURIAN; AMIRYAN, 2006), ao analisar baços envenenados por *Vipera raddei* verificou aumento no número de macrófagos dentro dos folículos e sugeriu serem reações inflamatórias moderadas e ativação do sistema complemento.

Os extratos de plantas citadas como antiofídicas, são encontrados em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, regiões da Ásia e das Américas (FÉLIX-SILVA et al., 2017). Este fato pode estar associado com a riqueza da flora, dessas regiões, bem como a necessidade relativa de terapias complementares para tratar envenenamentos por serpentes. Vários extratos e seus compostos isolados têm sido avaliados quanto a sua capacidade de bloqueio frente às atividades biológicas induzidas

pelos venenos de serpentes (ver revisão por MOURA; MOURÃO (2012)). No presente estudo, os tratamentos contendo o extrato de *B. dichotoma* (EaBd e EaBd/SAB) bloquearam as alterações na morfologia do baço dos animais envenenados por *B. atrox*. Ação bloqueadora desse extrato também já foi descrito para outros sítios em camundongos (MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2014).

O extrato aquoso da casca de *B. dichotoma*, é composto basicamente por ácidos graxos, flavonoides, terpenos, taninos hidrolisáveis e condensados (MOURA et al., 2013). A classe de enzimas Ca^{++} /dependentes Fosfolipases A_2 , presentes no veneno de *B. atrox*, são completamente inibidas pelo extrato de *B. dichotoma* (MOURA et al., 2013), com alta predominância de taninos condensados (MOURA et al., 2014; MOURA et al., 2017). A classe de enzimas Ca^{++} /dependentes Fosfolipases A_2 , presentes no veneno de *B. atrox*, são completamente inibidas pelo extrato de *B. dichotoma* (MOURA et al., 2013) quando testadas em protocolo de pré-incubação. A essa classe de enzimas são atribuídos os efeitos miotóxicos, cardiotoxicos, neurotóxicos, hemolíticos, hemorrágicos e anticoagulantes. Outra classe de enzimas, as metaloproteinases Zn^{++} /dependentes (hemorraginas), também tem sua atividade bloqueada pelos compostos presentes no extrato de *B. dichotoma* (MOURA et al., 2014). A ação bloqueadora do extrato deve estar relacionada à presença de compostos polifenólicos e taninos que precipitam as proteínas do veneno e formam complexos com o Zn^{++} e o Ca^{++} , inibindo a atividade das fosfolipases e metaloproteinases (MOURA et al., 2013; MOURA et al., 2014).

A técnica estereológica aplicada no presente estudo mostrou-se eficiente e acurada nas determinações. Os dados estereológicos de baços murinos sob ação de fitoterápicos são poucos e há total ausência de informações desse órgão envenenado por serpentes. A aplicação da técnica estereológica em baços humanos tem sido comum em estudos recentes (CAGLAR, V et al., 2014; CAGLAR, VELI et al., 2014). Variados estudos com aplicação da estereologia estão disponíveis com camundongos (NUTTER et al., 1980; ALANENTALO et al., 2007; SEYEDI, 2010). Uma vasta literatura está disponível sobre a aplicação das técnicas estereológicas que permitem o pesquisador desenvolver o protocolo mais adequado a seu estudo

(GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD, V.; REED, M. G., 2010; MOUTON, 2011).

Em nosso estudo, a etapa mais exaustiva foi na obtenção das seções seriais em resina histológica, contudo é uma das etapas mais importantes, pois irá garantir que cada região do órgão terá a mesma probabilidade de ser amostrada, um dos pilares centrais da estereologia (HOWARD, V.; REED, M. G., 2010). A aplicação do princípio de Cavalieri é extremamente facilitado pelo uso de programas gráficos de análise de imagens que já incorporaram módulos de estereologia e habilitam *plug-ins* aos usuários com os mais diversos sistemas de contagem (*grids*) possíveis. A estimativa do volume dos componentes que formam a microestrutura do baço tem sua aplicação facilitada pelo princípio de Delesse seguindo as mesmas inovações tecnológicas disponíveis. Essas estratégias facilitam a obtenção dos dados estereológicos. O último ponto a considerar diz respeito ao cálculo do erro das análises. Visto que as seções de um baço representam eventos dependentes é necessária à aplicação de técnicas estatísticas próprias da estereologia para tal determinação (CRUZ-ORIVE, 1980; GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981; GUNDERSEN, 1986; GUNDERSEN; JENSEN, 1987; CRUZ-ORIVE, 1999). No presente estudo, o uso de 10-12 seções obtidas ao longo de todo o órgão foi suficiente à determinação dos volumes gerando um coeficiente de erro abaixo de 5%. Esses dados suportam a precisão de nossa análise e também deixam claro que o uso de poucas seções (< 6) e não-seriais é altamente arriscado podendo comprometer o estudo e conduzir o pesquisador a elaborar conclusões errôneas baseado nas quantificações obtidas.

Em conclusão, este estudo mostrou que o extrato aquoso de *B. dichotoma* administrado por via oral logo após o envenenamento por *B. atrox* é efetivo na inibição das alterações morfológicas quantitativas no baço de camundongos avaliados após 24 h. A associação do extrato com o soro antibotrópico mantém a mesma efetividade bloqueadora, mostrando que o uso da terapia complementar usada pelas populações locais é efetiva na inibição dos efeitos sistêmicos provocados pelo envenenamento por *B. atrox*.

9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALANENTALO, T.; ASAYESH, A.; MORRISON, H.; LORÉN, C. E.; HOLMBERG, D.; SHARPE, J.; AHLGREN, U. Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. **Nature Methods**, v. 4, n. 1, p. 31, 2007.

AMBIKABOTHY, J.; IBRAHIM, H.; AMBU, S.; CHAKRAVARTHI, S.; AWANG, K.; VEJAYAN, J. Efficacy evaluations of Mimosa pudica tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 257-262, 2011.

AZNAURIAN, A. V.; AMIRYAN, S. V. Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera raddei* (Armenian adder). **Toxicon**, v. 47, n. 2, p. 141-143, 2006.

BADDELEY, A.; GUNDERSEN, H.-J. G.; CRUZ-ORIVE, L. M. Estimation of surface area from vertical sections. **Journal of Microscopy**, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.

BALOGH, P.; HORVÁTH, G.; SZAKAL, A. K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, n. 10, p. 1287-1298, 2004.

BARTHOLD, S. W.; GRIFFEY, S. M.; PERCY, D. H. **Pathology of laboratory rodents and rabbits**. John Wiley & Sons, 2016. v. p. p.

BAUMGRATZ, J. F. A. **Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma***. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691>>. Acesso em: Setembro, 2014.

BERNARDE, P. S.; GOMES, J. D. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 42, p. 65-72, 2012.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; MACHADO, C. A profile of snake bites in Brazil, 2001 to 2012. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M.; DOS-SANTOS, M. C. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 637-646, 1999.

BRASIL. Ofídismo. In: FUNASA (Eds.). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 1. ed. Brasília, 2001. cap. 1. p. 122.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). **Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000 a 2013**. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. . **Ministério da Saúde do Brasil. Serpentes, situação epidemiológica - Dados [internet]**. Brasília, 2016.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806-818, 2013.

CAGLAR, V.; ALKOC, O.; UYGUR, R.; SERDAROGLU, O.; OZEN, O. Determination of normal splenic volume in relation to age, gender and body habitus: a stereological study on computed tomography. **Folia Morphologica**, v. 73, n. 3, p. 331-338, 2014.

CAGLAR, V.; KUMRAL, B.; UYGUR, R.; ALKOC, O. A.; OZEN, O. A.; DEMIREL, H. Study of volume, weight and size of normal pancreas, spleen and kidney in adults autopsies. **Forensic Medicine and Anatomy Research**, v. 2, n. 03, p. 63, 2014.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. 1. ed. New York: Comstock Publishing Associates Ithaca, 2004. v. 1. 1032 p. p.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 38. p. 419-431.

CARDOSO, J. L. C. A fitoterapia antiveneno na medicina brasileira. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e**

terapêutica dos acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 481-485.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Servier, 2009. v. p. p.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109-124, 2012.

CAVALIERI, B. 1635. Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota. **Bologna. First edition Bologna**, v. 1635.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 455-465, 2006.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.

CRUZ-ORIVE, L. M. On the estimation of particle number. **Journal of microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15-27, 1980.

CRUZ-ORIVE, L. M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182-198, 1999.

CRUZ-ORIVE, L. M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182-198, 1999.

DA SILVA, C.; JORGE, M.; RIBEIRO, L. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 251-255, 2003.

DA SILVA, N. M.; ARRUDA, E. Z.; MURAKAMI, Y. L.; MORAES, R. A.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by Bothrops snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 196-205, 2007.

DE MORAIS, I. C. O.; TORRES, A. F. C.; DA SILVA PEREIRA, G. J.; PEREIRA, T. P.; BEZERRA, R. R. D. P. P.; MELLO, C. P.; JORGE, A. R. C.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, 2013.

DE SOUZA, C. A.; KAYANOB, A. M.; SETÚBALA, S. S.; PONTESA, A. S.; FURTADOA, J. L.; KWASNIEWSKIA, F. H.; ZAQUEOA, K. D.; SOARESB, A. M.; STÁBELIA, R. G.; ZULIANIA, J. P. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. v., 2012.

DIJKSTRA, C. D.; VEERMAN, A. Normal anatomy, histology, ultrastructure, rat. In: (Eds.). **Hemopoietic System**: Springer, 1990. p. 185-193.

DOS-SANTOS, M. C. Serpentes peçonhentas e ofidismo no Amazonas. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 11. p. 132-142.

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 648-655, 2006.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; DE NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; FONTELES, M. C. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A 2. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1061-1070, 2010.

FEITOSA, E. S.; SAMPAIO, V.; SACHETT, J.; CASTRO, D. B. D.; NORONHA, M. D. D. N.; LOZANO, J. L. L.; MUNIZ, E.; FERREIRA, L. C. D. L.; LACERDA, M. V. G. D.; MONTEIRO, W. M. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 34-41, 2015.

FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J. A.; XAVIER-SANTOS, J. B.; PASSOS, J. G.; SILVA-JUNIOR, A. A.; TAMBOURGI, D. V.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, 2017.

FITA, D. S.; NETO, E. C. M.; SCHIAVETTI, A. 'Offensive'snakes: cultural beliefs and practices related to snakebites in a Brazilian rural settlement. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 1, p. 1, 2010.

FREITAS DE SOUSA, L.; AMAZONAS, D.; SOUSA, L.; SANT'ANNA, S.; NISHIYAMA, M.; SERRANO, S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; CHALKIDIS, H.; MOURA-DA-SILVA, A.; MOURAO, R. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin,

the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochimie**, v. 118, p. 60-70, 2015.

FUNG, S.; TAN, N.; LIEW, S.; SIM, S.; AGUIYI, J. The protective effects of *Mucuna pruriens* seed extract against histopathological changes induced by Malayan cobra (*Naja sputatrix*) venom in rats. **Tropical biomedicine**, v. 26, n. 1, p. 80-84, 2009.

GOPI, K.; RENU, K.; VISHWANATH, B. S.; JAYARAMAN, G. Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality. **Journal of ethnopharmacology**, v. 165, p. 180-190, 2015.

GUNDERSEN, H.-J. G. Stereology of arbitrary particles. **Journal of microscopy**, v. 143, n. 1, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1- 6, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H.; JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. **Journal of microscopy**, v. 147, n. 3, p. 229-263, 1987.

GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, p. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 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.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Critical reviews in toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1-19, 1999.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. 2. ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. v. p. p. 278.

HOWARD, V.; REED, M. G. **Unbiased stereology**. 2010. v. p. p.

ISAZA, M.; HIPÓLITO, J.; OROZCO, L. M.; RIVERA, D. A.; TAPIAS, L. J.; RAMÍREZ, A.; STELLA, L.; VELOZA, C.; ANGELA, L.; ZULETA, L. M. Perfiles cromatográficos preliminares por GC-MS de algunas especies de plantas melastomatáceas. **Scientia et Technica**, v., n. 33, p. 359-362, 2007.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KIERNAN, J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice. **Shock**, v. 12, n. 6, p. 479, 1999.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.

LOSCO, P. Normal development, growth, and aging of the spleen. **Pathobiology of the aging rat**, v. 1, p. 75-94, 1992.

MARTINES, M. S.; MENDES, M. M.; SHIMIZU, M. H.; RODRIGUES, V. M.; DE CASTRO, I.; FERREIRA FILHO, S. R.; MALHEIROS, D. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Effects of Schizolobium parahyba extract on experimental Bothrops venom-induced acute kidney injury. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e86828, 2014.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1131-1142, 1992.

MATSUNO, K.; EZAKI, T.; KOTANI, M. Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. **Cell and tissue research**, v. 257, n. 3, p. 459-470, 1989.

MAYHEW, T. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, v. 76, n. 5, p. 639-665, 1991.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 606, 2005.

MEBIUS, R. E.; NOLTE, M. A.; KRAAL, G. Development and function of the splenic marginal zone. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 24, n. 6, 2004.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 4. p. 42-70.

MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 403-409, 1988.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOURA, V. M.; BEZERRA, A. N. S.; MOURÃO, R. H. V.; LAMEIRAS, J. L. V.; RAPOSO, J. D. A.; SOUSA, R. L.; BOECHAT, A. L.; OLIVEIRA, R. B.; CHALKIDIS, H. M.; DOS-SANTOS, M. C. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, n. 0, p. 59-68, 2014.

MOURA, V. M.; DE SOUZA, L. Y. A.; DA COSTA GUIMARÃES, N.; DOS SANTOS, I. G. C.; DE ALMEIDA, P. D. O.; DE OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V.; DOS-SANTOS, M. C. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn.(Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196, p. 168-177, 2017.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 3, p. 17-26, 2012.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D. A.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, M. N.; MOURÃO, R. H. V. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURA, R. H. V. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

MOUTON, P. R. **Unbiased stereology: a concise guide**. 1. ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, 2011. v. p. p.

NUTTER, R. L.; GRIDLEY, D. S.; SLATER, J. M.; MCMILLAN, P. J. Responses of mouse spleen morphology to the growth of subcutaneously injected virally transformed cells. **The Anatomical Record**, v. 197, n. 3, p. 363-368, 1980.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1–2, p. 213-216, 2005.

ORIVE, L. M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15-27, 1980.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.; GARCÍA, M.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: Traditional use of plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 493-504, 2000.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

RAPOSO, J. B.; DEL CARMEN MÉNDEZ, M.; BAIALARDI, C. E. G.; RAFFI, M. B. Acidente ofídico em equino no sul do Brasil-Relato de caso. **Revista da FZVA**, v. 7, n. 1, 2000.

RENNER, S. S. A revision of *Pterolepis* (Melastomataceae: Melastomeae). **Nordic Journal of Botany**, v. 14, n. 1, p. 73-104, 1994.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, n. 6, p. 471-479, 2001.

ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 1, p. 19-24, 2002.

SAITO, H.; YOKOI, Y.; WATANABE, S.; TAJIMA, J.; KURODA, H.; NAMIHISA, T. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. **Developmental Dynamics**, v. 181, n. 3, p. 235-252, 1988.

SAJON, S. R.; SANA, S.; RANA, S. Anti-venoms for snake bite: A synthetic and traditional drugs review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 3, p. 190-197, 2017.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57-60, 1970.

SCHULZ, C.; PERDIGUERO, E. G.; CHORRO, L.; SZABO-ROGERS, H.; CAGNARD, N.; KIERDORF, K.; PRINZ, M.; WU, B.; JACOBSEN, S. E. W.; POLLARD, J. W. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 86-90, 2012.

SEYEDI, F. Quantitative study of the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node. **Archives of Iranian medicine**, v. 13, n. 4, p. 294, 2010.

SILVA, A.; GUNAWARDENA, P.; WEILGAMA, D.; MADUWAGE, K.; GAWARAMMANA, I. Comparative in-vivo toxicity of venoms from South Asian hump-nosed pit vipers (Viperidae: Crotalinae: Hypnale). **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 471, 2012.

SINITOX. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. **Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas** 2012.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2442, 2013.

SOUSA, L. F.; PORTES-JUNIOR, J. A.; NICOLAU, C. A.; BERNARDONI, J. L.; NISHIYAMA-JR, M. Y.; AMAZONAS, D. R.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; MOURÃO, R. H.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. **Journal of Proteomics**, v. 159, p. 32-46, 2017.

STEINIGER, B. S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. **Immunology**, v. 145, n. 3, p. 334-346, 2015.

VAN REES, E.; SMINIA, T.; DIJKSTRA, C. Structure and development of the lymphoid organs. **Pathobiology of the aging mouse**, v. 1, p. 173-187, 1996.

VENKATESAN, C.; SARATHI, M.; BALASUBRAMANIAN, G.; THOMAS, J.; BALACHANDER, V.; BABU, V. S.; BILAL, S. M. Y.; MAJEED, S. A.; MADAN, N.; RAJ, N. S. Antivenom activity of triterpenoid (C₃₄H₆₈O₂) from *Leucas aspera* Linn. against *Naja naja* venom induced toxicity: Antioxidant and histological study in mice. **Human & experimental toxicology**, v. 33, n. 4, p. 336-359, 2014.

WALDEZ, F.; VOGT, R. C. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 681-696, 2009.

WARD, J.; MANN, P.; MORISHIMA, H.; FRITH, C. Thymus, spleen, and lymph nodes. **Pathology of the Mouse (Maronpot RR, ed). Cache River Press, Vienna, IL**, v., p. 333-360, 1999.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. (Eds.). **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. 1. ed. New York: Comstock Publishing Associates Ithaca, 2004. p. 709-761.

WEIBEL, E. R. Stereological methods. **Practic methods for biological morphometry**, v., p. 1-17, 1980.

WEN, F. H. Soroterapia. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. cap. 42. p. 432-445.

WHO. World Health Organization. List of neglected tropical diseases. 2014. 2014.

ZENI, A.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 664-676, 2007.

ANEXOS

- 1. Autorização comitê de ética para utilização de animais.**
- 2. Autorização SISBIO para coleta de serpentes.**
- 3. Autorização SISBIO para coleta de serpentes.**



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 43/11

Título do Projeto de Pesquisa: Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox* da região de Santarém-PA.

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Rosa Helena Veras Mourão.

Instituição: Universidade Federal do Oeste do Pará.

Data do Parecer: 17/10/11.

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

LIBERADO para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 17 de outubro de 2011.

Rosa Helena de F. Chaves
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV/PA 2029

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14018-8	Data da Emissão: 29/08/2013 17:50	Data para Revalidação*: 28/09/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: HIPÓCRATES DE MENEZES CHALKIDIS	CPF: 631.999.982-91
Título do Projeto: ECOLOGIA E HISTÓRIA NATURAL DE UMA TAXOCENOSE DE SERPENTES DA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS, BELTERRA, PA, BRASIL.	
Nome da Instituição: Instituto Santarém de Educação Superior	CNPJ: 05.410.725/0001-71

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Georreferenciamento das áreas	03/2009	03/2009
2	Instalação das armadilhas	03/2009	06/2009
3	Abertura das fitas	03/2009	06/2009
4	Coleta de espécimes	03/2009	12/2014
5	Tratamento nas coleções	03/2009	12/2014
6	Retirada das armadilhas	01/2015	01/2015
7	Entrega do relatório final	02/2015	02/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação da legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falta descrição de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso e componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contatar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreescoltadas ou ameaçadas de sobreescoltado.

Outras ressalvas

1	1-Os pir-fal devem conter aparatos que diminuam stress (insolação e/ou afogamento) dos animais, os quais devem ser fechados ou retirados quando inativos. O pesquisador é responsável pela inspeção das armadilhas diariamente. 2) O quantitativo poderá ser restringido pelos gestores da FLONA Tapajós. 3) A coleta de 20 espécimes/espécie de squamata deve ser para taxa abundantes, especialmente de lagartos. O pesquisador deve ter parcimônia nas coletas com serpentes. Preferencialmente deverá coletar os animais já mortos. 4) Para trabalho de dieta recomendamos o uso de técnicas que preservem os animais, tais como FLUSHING (SOLE, M.; BECKMANN, O.; PELZ, B.; KWET, A. 2005. Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol...Studies on Neotropical Fauna and Environment 40(1):23-28).
---	--

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 19676647



Página 1/5