

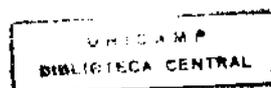
**UNICAMP**

**Estudo do efeito antiinflamatório do Veneno de  
Abelha *Apis mellífera* africanizada em modelos  
de inflamação aguda e crônica**

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor.*

*Suzel A. Frem Bourgerie*

Campinas - 1994



UNIDADE	PK
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	B.666e
V.	Ex.
TCARAC.	85/23408
PROJ.	433/95
C	[ ] [ ] [ ] [ ]
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/01/95
N.º CPD	

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Central - Unicamp

CM-00065432-7

Bourgerie, Suzel Aparecida Frem

**B666e** Estudo do efeito antiinflamatório do veneno de abelha *Apis Mellifera africanizada* em modelos de inflamação aguda e crônica/Suzel Aparecida Frem Bourgerie - Campinas, SP: [s.n.], 1994.

Orientadores: Carlos Alberto Flores, João Francisco Marques Neto.

Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Abelha africanizada - Veneno.

2. Artrite.

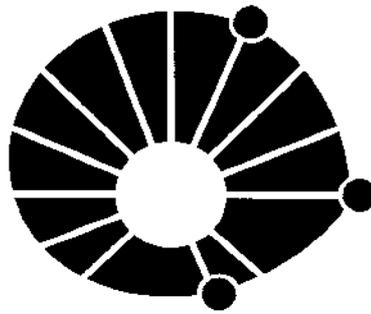
3. Artrite.

I. Flores, Carlos Alberto.

II. Marques Neto, João Francisco.

III. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Médicas.

IV. Título.



**UNICAMP**

**Estudo do efeito antiinflamatório do Veneno de  
Abelha *Apis mellífera* africanizada em modelos  
de inflamação aguda e crônica**

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor.*

Aluna:	Suzel A. Frem [Bourgerie] <i>16/06/1994</i>
Orientador:	Prof. Carlos Alberto [Flores] <i>t</i>
Co-orientador:	Prof. Dr. João Francisco [Marques Neto] <i>t</i>

Campinas - 1994

*Dedico este trabalho*

*A meus pais Jamil e Jandira, que com seus exemplos de coragem, doação, companheirismo e trabalho fecundos, ensinaram-me a nunca me deixar abater pelos empecilhos.*

*A minha irmã Sandra, pela imensa ajuda nos momentos difíceis.*

*A meu marido Denis, que com seu brilhante desassombro, foi quem primeiro em mim semeou a idéia deste trabalho, entusiasmando-me com os resultados, sem jamais murmurar pela minha ausência.*

*A minha filha Camila, presente divino, que com sua imensa doçura é a fonte da minha motivação para tentar semear mais dignidade, consolo e alívio ao sofrimento humano.*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho. De forma especial, agradeço:

Ao Professor Carlos Alberto Flores, pela dedicada orientação científica e forma amigável com que me acolheu em seu laboratório, fornecendo os meios técnicos necessários para o bom andamento desse projeto, não poupando esforços na procura de me ajudar, com o seu impecável raciocínio científico, a tornar este trabalho o mais perfeito possível.

Ao Professor Doutor. João Francisco Marques Neto, que com seu conhecimento científico e brilhante capacidade realizadora em muito contribuiu para minha formação desde os tempos acadêmicos. Agradeço também, pela forma elegante e primorosa da sua co-orientação, dedicando atenção efetiva e constante ao desenvolvimento deste trabalho, acreditando no seu valor e procurando fazê-lo reconhecido no meio científico.

Ao Professor Doutor. Silvio dos Santos Carvalho, meu primeiro e inigualável mestre na arte da Medicina, pelo empenho, sacrifício e constante disponibilidade, para me transmitir o seu extraordinário conhecimento médico. Agradeço também, pelo testemunho que é, de dignidade, caráter e de humilde brilhantismo no meio de nós, e dentro da medicina brasileira.

A Professora Julia Franceschi, mestra querida, pela receptividade carinhosa e amigável com que me acolheu no Departamento de Farmacologia da UNICAMP, colocando-se sempre disponível para me auxiliar no que fosse necessário.

Ao meu marido Denis, proprietário do Apiário São José, que gentilmente ofereceu o aparelho de extração do veneno e incansavelmente realizou a coleta da apitoxina.

A Doutora Patrícia Sabino de Mattos pela sua disponibilidade e auxílio nos estudos histopatológicos, abrindo as portas do Departamento de Patologia da PUCAMP para que parte desse trabalho ali se realizasse.

A Doutora Eliane Maria Ingrid Amistalden pela amizade e atenção a mim dedicadas e pelo entusiasmo e brilhantismo científico na análise e esclarecimentos às consultas de lâminas. Agradeço também por todo o seu gentil auxílio na confecção da fotomicrografia.

Ao Professor Edson Antunes por toda a sua atenção a mim dedicada, principalmente pela sua disponibilidade e paciência na orientação do manuseio com os ratos e o pletismógrafo.

Ao Professor Doutor Gilberto De Nucci, por abrir as portas do seu laboratório, permitindo a utilização do pletismógrafo.

Aos técnicos do Departamento de Farmacologia Antonio Vilson dos Santos e Ailton Fernando de Paula, pelos inestimáveis auxílios na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Sr. Rubens de Mello, funcionário do Departamento de Farmacologia da FCM de Ribeirão Preto, pela disponibilidade em realizar com tanta competência a adrenalectomia.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia Patológica da PUCAMP, pela realização da preparação das lâminas.

*O Eterno tudo criou sem exceção.  
Só o Senhor será considerado justo.  
Quem poderá compreender as suas maravilhas?  
Quem poderá descrever todo o poder de sua grandeza?  
Quem empreenderá a explicação de sua misericórdia?  
Nada há a subtrair, nada a acrescentar às maravilhas de Deus;  
elas são incompreensíveis.  
Quando o homem tiver acabado, então estará no começo;  
e quando cessar a pesquisa, ficará perplexo.*

# Índice

<b>I</b>	<b>Introdução</b> .....	9
	1. Considerações Gerais .....	9
	2. Artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund .....	12
	2.1 Quadro clínico .....	13
	2.2 Estudo anatomo-patológico .....	13
	2.3 Fisiopatogenia .....	14
	3. Veneno de abelha (VA) .....	15
	3.1 Composição química do veneno de abelha .....	15
	3.2 Efeito do VA e agentes farmacológicos na artrite por adjuvante completo de Freund .....	18
	3.3 Efeito do VA e suas frações na resposta adrenocortical .....	18
	3.4 Outros prováveis mecanismos de ação do VA como anti inflamatório .....	20
	4. Objetivos .....	21
<b>II</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	22
	1. Animais e Anestesia .....	22
	2. Obtenção do veneno de abelha africanizada (VAA) .....	23
	3. Modelos de Inflamação .....	23
	3.1 Inflamação aguda: edema de pata .....	23
	3.2 Inflamação crônica: modelo de artrite experimental induzida pelo adjuvante completo de Freund .....	24
	3.2.1 Curso temporal e quadro clínico .....	24
	3.2.2 Avaliação histopatológica .....	24
	4. Efeito antiinflamatório do VAA .....	25
	4.1 Modelo de inflamação aguda .....	25
	4.1.1 Animais normais .....	25
	4.1.2 Animais adrenalectomizados .....	26
	4.2 Modelo de Inflamação crônica .....	26
	4.2.1 Regime profilático .....	26
	4.2.2 Regime terapêutico .....	27
	5. Análise Estatística .....	27

<b>III Resultados</b> .....	29
1. Inflamação aguda: Edema de pata.....	29
1.1 Curso temporal e curva dose-resposta do edema de pata induzido pela carragenina.....	29
1.2 Curso temporal e curva dose-resposta do edema de pata induzido pela dextrana.....	30
1.3 Curso temporal e curva dose-resposta do edema de pata induzido pelo VAA .....	30
2. Efeito antiinflamatório do VAA no Modelo de Inflamação Aguda.....	30
2.1 Ratos normais.....	30
2.1.1 Carragenina .....	30
2.1.2 Dextrana .....	30
2.1.3 VAA.....	30
2.2 Ratos adrenalectomizados.....	35
3. Inflamação Crônica .....	35
3.1 Curso temporal do desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund e quadro clínico.....	35
3.2 Histopatologia.....	35
4. Efeito Antiinflamatório do VAA sobre a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund.....	45
4.1 Regime Profilático .....	45
4.2 Regime Terapêutico .....	52
<b>IV Discussão</b> .....	54
<b>V Resumo</b> .....	66
<b>VI Summary</b> .....	68
<b>VII Referências Bibliográficas</b> .....	70

# **I Introdução**

## **1. Considerações Gerais**

O veneno obtido da abelha *Apis mellifera* tem sido citado desde os tempos mais remotos como apresentando possíveis efeitos antiartríticos. Encontraram-se relatos de que Hipócrates fazia seus doentes reumáticos serem picados por abelhas no local das articulações a fim de obter alívio da dor (appud WILLIAMS & WILKENS, 1964).

Embora exista ainda considerável folclore sobre o assunto, a terapia com o veneno de abelha (VA) continua sendo referida em doenças reumáticas (MABERLY, 1910; BECK, 1935; PANUSH, 1988) e largamente utilizada, mesmo hoje, na Europa, China e na Rússia (CHANG & BLIVEN, 1979).

Hoje é indiscutível a efetividade do VA na dessensibilização dos processos alérgicos, mas para a sua utilização nas artrites humanas faltam ainda conclusões de maior suporte científico, que venham justificar o seu emprego como uma terapia alternativa frente às já tradicionalmente utilizadas (LOCKSHIN, 1981).

Na tentativa de comprovar cientificamente a sua eficácia e elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos, vários estudos sobre o efeito do VA em inflamação experimental têm sido publicados recentemente.

As primeiras referências deste século utilizando o VA como terapia nas artrites datam de 1910, quando MARBELY usou-o para tratar dois pacientes com febre reumática. Um deles recebeu 18 picadas semanais, obtendo, segundo o autor, melhora do quadro clínico com desaparecimento quase total das dores articulares.

Em 1935, BECK também admitiu a eficácia do VA como antiartrítico, porém, HOLLANDER, em 1941, tratando quarenta e dois pacientes portadores de artrite crônica com VA, não obteve resultado diferente dos pacientes controle (19% e 18% respectivamente), concluindo que o grau de melhora era desanimador. No entanto, foi somente a partir da década de 70 que o VA começou realmente a ser estudado em modelos de inflamação experimental, particularmente no edema de pata de ratos induzido pela carragenina e na artrite induzida por adjuvante completo de Freund (LORENZETTI *et alii*, 1972; ZURIER *et alii*, 1973; CHANG & BLIVEN, 1979; TANNENBAUM & GREENSPOON, 1982; HADJIPETROU KOUROUNAKIS & YIANGOU, 1984; SOMERFIELD, 1986).

O edema de pata tem se mostrado um método, *in vivo*, amplamente utilizado para avaliar inflamação aguda em resposta a vários estímulos flogísticos, de natureza imunológica ou não.

Desde que o grupo de WINTER introduziu a carragenina (mucopolissacarídeo derivado de uma alga irlandesa, o *Chondrus* sp) como um agente flogístico para a indução do edema de pata, este teste tem se tornado um dos mais utilizados no estudo dos mediadores envolvidos no desenvolvimento do edema associado ao processo inflamatório, sendo também empregado para “screening” de novas drogas antiinflamatórias, particularmente aquelas de interesse para o tratamento das artrites humanas. (WINTER *et alii*, 1962). A maioria das drogas antiinflamatórias não esteróides foram descobertas por essa metodologia e tem sido demonstrado que as doses necessárias para inibir o edema de pata induzido pela carragenina, em ratos, apresentam alto grau de correlação com as doses clinicamente úteis no homem (OTTERNESS & MOORE, 1988).

Segundo Di ROSA *et alii* (1970) o edema de pata de rato induzido por carragenina apresenta, em relação ao envolvimento de mediadores inflamatórios, três fases distintas: uma fase inicial, até a primeira hora após a injeção do estímulo, onde ocorre a liberação de histamina e 5HT; uma segunda fase mediada por cininas, até a segunda hora e, finalmente, uma terceira fase, entre a terceira e sexta horas, no qual as prostaglandinas são os prováveis mediadores. Todos esses mediadores, no entanto, parecem ser dependentes para a sua ação da presença de títulos normais de complemento.

VINEGAR *et alii* (1976) propuseram que a fase inicial do edema de pata induzido pela carragenina era mediada por mastócitos. BANKS *et alii* (1980) observaram que em animais depletados de mastócitos a formação do edema, na primeira hora após a injeção de carragenina, era quase totalmente suprimida, enquanto que a fase tardia permanecia inalterada. Por outro lado, nem os antagonistas dos receptores histamínicos do tipo H1, como a mepiramina, nem o bloqueio dos receptores serotoninérgicos com a metisergida suprimiram a fase inicial desse edema (BANKS *et alii*, 1990).

Pesquisas mais recentes indicam que o PAF, ou material similar, também é liberado e contribui para a resposta inicial do edema induzido pela carragenina (OTTERNESS & MOORE, 1988).

Os experimentos realizados pelo grupo de Di ROSA com albumina marcada mostraram que a resposta vascular máxima, no caso do edema de pata por carragenina, ocorria na quarta hora, isto é, a máxima resposta dos vasos sanguíneos era coincidente com a fase da inflamação mediada pelas prostaglandinas (Di ROSA *et alii*, 1970). No entanto, embora esses mediadores, por si só, não induzam aumento da permeabilidade, eles potenciam os efeitos pró-inflamatórios de vários mediadores envolvidos na inflamação (FERREIRA & VANE, 1974). Através desses dados, os autores reafirmaram que o edema podia ser uma medida indireta da exsudação e que esse modelo se presta para o estudo do efeito de drogas antiinflamatórias sobre os fenômenos vasculares da inflamação.

Além de injetada na pata de ratos, a carragenina vem também sendo usada como estímulo inflamatório na pleura e no peritônio (Di ROSA *et alii*, 1970). Nessas serosas, verifica-se que o pico de exsudação é concomitante com o pico de migração celular, particularmente de células polimorfonucleares neutrófilos, o que faz pensar que a carragenina induz um edema dependente de células, ao contrário do dextrana cujo edema é histamina dependente (Di ROSA *et alii*, 1970; VINEGAR *et alii*, 1976).

A indometacina e a dexametasona são efetivos em inibir a formação de edema de pata por carragenina, e conseqüentemente, a exsudação de proteínas. Esta inibição, no caso da indometacina, é efetiva pois há um bloqueio da síntese de prostaglandinas pela inibição da

ciclooxigenase. No caso da dexametasona a inibição se deve ao bloqueio da liberação de histamina através de uma ação direta em mastócitos, além da inibição da fosfolipase A2, via liberação de lipocortinas (FLOWER, 1989), com consequente bloqueio da produção de prostaglandinas e leucotrienos (SCHLEIMER *et alii*, 1989). Outro mecanismo da ação antiinflamatória da dexametasona é a sua capacidade de inibir a síntese/liberação de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas para leucócitos (RIBEIRO *et alii*, 1991).

Alguns pesquisadores tem demonstrado a atividade antiinflamatória do VA integral sobre o edema de pata, em ratos, induzido pela carragenina (CHANG & BLIVEN, 1979; SOMERFIELD, 1986).

Outros (BILLIGHAN *et alii*, 1973; HANSON *et alii*, 1974; BANKS *et alii*, 1980; BANKS *et alii*, 1990) utilizando isoladamente um dos componentes do VA, denominado peptídeo MCD-401, também verificaram ser esse peptídeo altamente efetivo em inibir a formação do edema de pata por carragenina. BILLINGHAN *et alii* (1973) relataram que o peptídeo MCD-401 foi cerca de cem vezes mais potente que a hidrocortisona para inibir esse edema.

## **2. Artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund**

Outro modelo utilizado largamente para estudar inflamação e avaliar a atividade antiinflamatória de drogas é a artrite induzida por adjuvante completo de Freund. O termo adjuvante de Freund se refere a adjuvantes compostos de bactéria seca ou componentes da parede celular bacteriana (como o peptídeoglicano) dissolvidos em um veículo oleoso (óleo mineral, óleo de oliva, squalene ou hexadecame), com ou sem agentes emulsificantes. Apesar da *Mycobacteria (butyricum* ou *tuberculosis*) ser a mais comumente usada nessas preparações, outros microorganismos artrogênicos podem ser empregados, como o *Corynebacteria*, *Streptococcus*, *Nocardia* e várias outras bactérias Gram-positivas (CHANG *et alii*, 1980; TAUROG *et alii*, 1988). Essa artrite, que se parece à artrite reumatóide humana em muitos aspectos, tem sido interpretada como resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia à constituintes da parede celular bacteriana (TAUROG *et alii*, 1988).

A artrite induzida por adjuvante, também referida como artrite por adjuvante ou doença por adjuvante, foi descrita pela primeira vez por STOERCK em 1954 (appud TAUROG *et alii*, 1988).

Dois anos mais tarde, demonstrou-se que uma única injeção do adjuvante era suficiente para provocar a doença (PEARSON *et alii*, 1956).

Estudos posteriores de histopatologia e de resposta às drogas antiinflamatórias e imunossupressoras estabeleceram essa artrite como um modelo experimental correspondente a artrite reumatóide humana (CHANG & BLIVEN, 1979).

Grande parte do bom desenvolvimento dessa artrite experimental está na dependência de algumas características do animal. Ratos mais jovens que cinco semanas são relativamente resistentes á artrite por adjuvante, estando na faixa ideal os animais de seis a dez semanas, com peso entre 150 e 250 gramas. Observa-se, também, que há um marcante controle genético quanto à susceptibilidade e resistência à artrite por adjuvante, constatando-se uma significativa influência para o seu desenvolvimento, de genes ligados ao complexo maior de histocompatibilidade (TAUROG *et alii*, 1988).

## **2.1 Quadro clínico**

Após a inoculação de uma única dose de 0,05 a 0,1 ml de adjuvante completo de Freund, na região subplantar de uma das patas traseiras de ratos, observa-se, entre o quarto e o quinto dia, o aparecimento de um processo de inflamação aguda evidenciada por aumento do volume da pata injetada (TAUROG *et alii*, 1988). Entretanto, é em torno do décimo sexto dia que os ratos passam a apresentar um quadro severo e persistente de poliartrite, caracterizando a fase crônica do processo.

Essa poliartrite compromete particularmente as articulações tibio-társicas, metatarso-falangeanas e interfalangeanas proximais, chegando a ocorrer deformidades e marcada restrição da movimentação. Os animais perdem nitidamente peso. Acompanhando esse quadro, observam-se, também, nódulos subcutâneos nas orelhas e na cauda, e inflamação da genitália (balanite).

## **2.2 Estudo anatomo-patológico**

Os achados histológicos articulares e extraarticulares da artrite por adjuvante completo de Freund são bem característicos (PEARSON, 1956; CHANG *et alii*, 1980; TAUROG *et alii*, 1988).

Na fase aguda observam-se edema e infiltrado de polimorfonuclear, com predomínio de neutrófilos, nos tecidos periarticulares e na sinóvia, junto ao espaço articular, além de exsudato agudo intraarticular.

A partir do décimo sexto dia, ou seja, já na fase da artrite estabelecida, nota-se importante infiltrado de células mononucleares, particularmente linfócitos e plasmócitos, na sinóvia e tecidos periarticulares.

Embora a maioria desses achados sejam comuns em outras artrites experimentais, a formação de granulomas nos tecidos peirarticulares é característica única da artrite por adjuvante. Esses granulomas são formados por acúmulos de macrófagos e ocasionalmente células gigantes. O crescimento do tecido granulomatoso na sinóvia leva à formação do pannus, que cobre e adere à superfície articular, podendo levar à destruição da cartilagem. Observam-se, também, reabsorção da placa óssea subcondral por osteoclastos (PEARSON, 1956; TAUROG *et alii*, 1988).

### 2.3 Fisiopatogenia

A patogênese da poliartrite pelo adjuvante completo de Freund não está totalmente esclarecida (CHANG *et alii*, 1980). Há substancial número de argumentos indicando que um mecanismo imunológico está envolvido: a) invariável período de latência de pelo menos 10 dias entre a inoculação do adjuvante e o aparecimento da artrite; b) transferência de artrite para animais receptores pela administração de células linfóides de animais doadores doentes; c) um fenômeno similar à uma tolerância imunológica observado em animais que foram expostos ao adjuvante precocemente na vida; d) supressão da doença por globulina antilinfocítica heteróloga ou drogas imunossupressoras; e) hiperglobulinemia e acúmulo de células plasmáticas em linfonodos.

O agente imunológico responsável pelo desenvolvimento dessa artrite permanece, porém, desconhecido.

Tem sido sugerido que a artrite pode ser resultado de uma resposta de hipersensibilidade tardia ao bacilo ou seus constituintes, tais como o peptidoglicano que resiste a degradação de enzimas lisossômicas e pode permanecer nos macrófagos, servindo assim como uma fonte persistente de estímulo antigênico. A favor desse argumento está o fato dessa artrite poder ser induzida somente por preparações contendo certas paredes celulares bacterianas ou componentes isolados dali, em veículo oleoso próprio.

Por outro lado, também tem sido sugerido que ela possa ser o resultado de um processo autoimune do desenvolvimento de autoanticorpos e/ou, especificamente, linfócitos sensibilizados contra o próprio tecido animal ou uma proteína viral ou algum complexo envolvendo os dois componentes.

### 3. Veneno de abelha (VA)

#### 3.1 Composição química do veneno de abelha

A composição química do VA é de uma complexa mistura de substâncias orgânicas (cerca de 12%) diluídas em água (88%) (FERREIRA, 1990).

O veneno *in natura* é transparente, espesso, possui odor aromático *suis generis* e cristaliza-se em poucos minutos à temperatura ambiente.

A tabela 1 mostra os principais componentes do VA conforme O'CONNOR (1976) e RUSSEL (1967). Muito pouco foi acrescentado à esta tabela nos últimos anos (HABERMANN, 1972). Segundo esses autores, a quantidade e os tipos de amino-ácidos são os mais variados e a principal base livre encontrada é a histamina. A adrenalina e a dopamina são outras aminas também descritas no veneno (HABERMANN, 1972). A frutose e a glicose são os dois carboidratos encontrados nesta peçonha. Quanto aos lipídios, são descritos cerca de 5 a 6 fosfolipídios diferentes e, possivelmente, dois esteróides. Aproximadamente 14 pequenos peptídeos caracterizados apenas parcialmente estão presentes no veneno da abelha. Quanto às macromoléculas, estão bem caracterizadas a melitina e a apamina.

As enzimas que compõe o veneno são a hialuronidase, com peso molecular de 50.000 Daltons (FRANKLAND *et alii*, 1980), a fosfolipase-A, com peso molecular de 19.500 Daltons e a fosfolipase-B (HABERMANN, 1972). Além destas enzimas são relatadas cerca de quatro outras proteínas com propriedades antigênicas existentes no veneno da abelha. O ácidoápico é grande polipeptídeo rico em ácido glutâmico e ácido aspártico. Existem, além destas substâncias descritas, cerca de onze componentes ainda mal estudados. (FERREIRA, 1990). MELLO (1972) relata a presença de uma substância volátil, a isoamiloacetato.

A revisão feita por HABERMANN (1972) acerca da composição do veneno de abelha e suas ações nos fornece uma visão bem ampla e aceita pela maioria dos pesquisadores da área. Os dados referidos por este autor dizem respeito a estudos feitos tendo por meta a verificação dos efeitos farmacológicos e bioquímicos e foram realizados, na maioria das vezes, a partir de ensaios biológicos, *in vitro* ou usando-se animais de laboratório. As principais conclusões destes estudos são: a) os principais componentes ativos do veneno de abelha são cerca de dez, destacando-se a melitina, apamina, peptídeo degranulador do mastócito (MCD401-Peptídeo), minimine, histamina, hialuronidase, fosfolipase-A e fosfolipase-B; b) vários destes compostos têm ações e efeitos sinérgicos; c) muitos compostos ainda precisam ser melhor definidos com técnicas bioquímicas mais apuradas de separação molecular.

Resumidamente foram imputadas as seguintes ações e/ou efeitos aos componentes do veneno de abelhas:

Melitina: corresponde a 30% do peso do VA. É um polipeptídeo de 2.850 Daltons de peso molecular, com 26 aminoácidos e considerada a principal substância tóxica do VA, tanto em quantidade como em atividade.

Ela causa lise direta das hemácias(hemólise), leucócitos, plaquetas, mastócitos (ROTHSCHILD, 1965) e células musculares esqueléticas; inibe a potência tromboplástica dos preparados teciduais, paralisa a fosforilação oxidativa mitocondrial; pode promover constrição ou dilatação vascular na dependência do órgão examinado; despolimeriza a fibra cardíaca ou esquelética; produz dor *in vivo*; aumenta a permeabilidade vascular local; provoca contração lenta da musculatura lisa; bloqueia a transmissão neuro-muscular; altera a circulação e a respiração se inoculada no quarto ventrículo cerebral; danifica os sistemas enzimáticos das membranas; paralisa o crescimento de larvas de drosófilas (FERREIRA, 1990).

Tabela 1 - Composição química do veneno de abelha *Apis Mellifera*

<b>Tipo de componente</b>	<b>% em veneno seco</b>	<b>% em venenonatural</b>
água	-	88
moléculas pequenas:		
amino-ácidos	1	0,1
base-livre	2	0,2
açúcares	2	0,2
moléculas intermediárias:		
lipídios	5	0,5
histapeptídios	1	0,1
pequenos peptídios	15	1,5
macromoléculas:		
melitina	40-50	4,5
apamina	2	0,2
enzimas (hialuronidase e fosfolipases) e outras proteínas	10-15	1-2
ácidoápico	5	0,5
não identificados (cerca de 11 substâncias diferentes)	10	1,0

Apamina: corresponde a 2 % do VA sendo um polipeptídeo de 10 aminoácidos e peso molecular de 2.036 Daltons. É neurotóxica para o sistema nervoso central e não para a junção neuromuscular. Em ratos provoca convulsões, movimentos incoordenados e inintermitentes e respiração descoordenada. Nos animais que sobrevivem por mais de 60 horas produz hiperexcitabilidade (FERREIRA, 1990).

Peptídeo degranulador de mastócito (MCD401-peptídeo): corresponde a 2% do peso do VA e contém 22 aminoácidos (BREITHAUPT & HABERMANN, 1968; GAULDIE, 1976). Esse peptídeo apresenta poderosa atividade antiinflamatória (em doses tão baixas como 0,1 mg/Kg) em vários modelos de inflamação, como o edema de pata induzido pela carragenina e turpentina, artrite por adjuvante em ratos e permeabilidade de pele aumentada resultante da injeção subcutânea de bradicinina, prostaglandina E1, calicreína, histamina e 5HT (BILLINGHAN *et alii* 1973, HANSON *et alii*, 1974).

Atribui-se a ele poderoso efeito degranulador de mastócitos *in vitro*, levando a liberação de histamina e outros agentes farmacologicamente ativos. Foi originalmente relatado (BILLINGHAN, 1973; HANSON, 1974) que a atividade antiinflamatória desse peptídeo não dependia da sua ação sobre os mastócitos. Baseando-se nisso, BILLINGHAN *et alii* sugeriram que esse peptídeo poderia ser um agente terapêutico útil em algumas artrites.

Outros pesquisadores mais recentemente, no entanto, sugeriram que essas duas atividades ou seja, a atividade antiinflamatória e a degranuladora de mastócitos, correm paralelas (BANKS, 1980; DEMPSEY, 1985) e que a atividade antiinflamatória do peptídeo MCD parece também não depender de algum efeito direto sobre os polimorfonuclears neutrófilos. Para BANKS, esse peptídeo não é um verdadeiro agente antiinflamatório, exercendo a sua atividade através da degranulação de mastócitos, ou seja, é um contra-irritante (BANKS, 1980 e 1990).

Adolopina: polipeptídeo detectado pela primeira vez por HABERMANN & REIZ (1965) mas somente estudado recentemente (SHKENDEROV *et alii*, 1982). A adolapina mostrou ser um potente analgésico e possui ação antiinflamatória importante sobre o edema de pata induzido pela carragenina, prostaglandina, inibindo também cerca de 63% o aparecimento de artrite por adjuvante de Freund.

Admite-se que a atividade inibidora da ciclooxigenase da adolapina seja a base do mecanismo de seus efeitos analgésico e antiinflamatório. A ação antiinflamatória desse polipeptídeo não foi influenciada pela adrenalectomia (SHKENDEROV *et alii*, 1982).

Minimine: inibe a alimentação e crescimento e causa letargia em larvas de drosófilas (FERREIRA, 1990).

Histamina: além de ter ações e efeitos pró-inflamatórios (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) é importante na produção da dor no local da inoculação (FERREIRA, 1990).

Hialuronidase: promove a lise da substância fundamental do tecido conectivo (ácido hialurônico), facilitando a difusão do veneno; é alergênica (FERREIRA, 1990).

Fosfolipase-A e Fosfolipase-B: provocam a lise das hemáceas, contração da musculatura lisa, diminuição da pressão sangüínea, aumento da permeabilidade capilar no local da inoculação; causa mastocitólise; inibe a tromboplastina tecidual; é alergênica (FERREIRA, 1990).

### **3.2 Efeito do VAA e agentes farmacológicos na artrite por adjuvante completo de Freund**

Todas as drogas antiartríticas clinicamente estabelecidas, incluindo as drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais, cloroquina, sais de ouro e os agentes imunossupressores ciclofosfamida e metotrexate, são capazes de suprimir ou prevenir o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (KALLIOMAKI, 1964; WINTER, *et alii*, 1966; WALZ *et alii*, 1971; CHANG & BLIVEN, 1979; WELLES *et alii*, 1985).

Tem sido demonstrado por alguns pesquisadores que o VA também é capaz de suprimir essa artrite (LORENZETTI *et alii*, 1972; ZURIER *et alii*, 1973; CHANG *et alii* & BLIVEN, 1979; TANNENBAUN & GREENSPOON, 1982; HADJIPETROU-KOUROUNAKIS & YIANGOU, 1984; SOMERFIELD, 1986). A maior parte desses autores comprovou a eficácia do VA sobre a artrite, quando administrado tanto antes quanto após a injeção do adjuvante, embora os resultados tenham sido mais satisfatórios quando o VA era administrado antes ou junto com o adjuvante.

O peptídeo MCD-401, uma das frações do VA referida como possuidora de importante atividade antiinflamatória, também foi capaz de suprimir a artrite por adjuvante quando injetado junto com o próprio adjuvante ou mesmo quando a artrite já estava clinicamente instalada (BILLINGHAN *et alii*, 1973; BANKS *et alii*, 1990). Essa sua atividade antiinflamatória pareceu não se modificar nos animais adrenalectonizados, ao contrário do que se observou quando se utilizou o VA integral.

### **3.3 Efeito do VAA e suas frações na resposta adrenocortical**

As informações de que se dispõe na literatura a respeito da ação do VA sobre a glândula adrenal revelam que a apitoxina estimula a secreção endógena de glicocorticóide pela córtex da adrenal, através da estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

NEWMAN & STRACKE, em 1951, já haviam formulado a idéia de que a ação do VA sobre a artrite induzida por formaldeído deveria ser por aumento da secreção adrenocortical.

WEIDMAN & MOLLER (1953) e ARTEMOV (1964) observaram que o VA causava uma depleção do ácido ascórbico contido na córtex da adrenal e que isso não acontecia se os animais fossem hipofisectomizados.

COUCH & BENTON (1972) estudaram, em ratos, tanto o efeito de injeções únicas de VA, em concentrações variadas, durante um período de 24 horas, como o efeito de sua administração crônica (duas vezes por semana, por até 8 semanas) sobre os níveis plasmáticos de corticosterona. Os resultados revelaram que o VA, especialmente quando injetado em altas concentrações (4mg/Kg), por via sub-cutânea ou intraperitoneal, produzia acentuada estimulação da glândula adrenal. Uma única injeção de VA, monitorizada por 24 horas, mostrou que as alterações mais significativas dos níveis de corticosterona se davam na primeira hora (aumento de três vezes em relação aos controles). Os estudos crônicos revelaram que ratos injetados com altas doses de VA apresentavam níveis mais elevados de corticosterona na quarta semana, embora já se mostrassem aumentados a partir da segunda semana.

A hiperatividade da resposta adrenocortical, demonstrada pelo aumento dos níveis séricos de corticosteróides, indica uma resposta aumentada na secreção de ACTH pelo VA. Como a histamina leva a um aumento da resposta adrenal, chegou-se a pensar que a ação do VA sobre os níveis de corticosteróides séricos poderia ser devida às suas propriedades em liberar histamina. Porém, injetando-se esse autacóide, em ratos, em quantidades que excediam normalmente àquelas liberadas em uma inflamação (ROCHA & SILVA, 1966), não se encontraram elevações significativas nos níveis de corticosteróides. Concluiu-se, então, que a ação do VA na resposta adrenocortical provavelmente não dependia exclusivamente da sua propriedade liberadora de histamina, devendo ser considerados outros mecanismos.

Várias possibilidades foram levantadas para explicar essa resposta aumentada do ACTH. A capacidade do VA em produzir lisolecitina *in vivo* (HABERMANN, 1968) poderia causar aumento do ACTH, desde, que a lisolecitina aumenta a liberação de epinefrina pela medula adrenal, que por sua vez, pode causar liberação de ACTH (TUNNER, 1966). Essa liberação de epinefrina produzida pela lisolecitina é de longa duração e poderia causar elevações prolongadas nos níveis séricos de corticosteróides, tais como os produzidos pelo VA. A queda desses níveis a partir de 24 horas indica, porém, que o efeito do VA é reversível ou que há uma exaustão do tecido adrenal (appud COUCH & BENTON, 1972).

Além disso, o VA contém melitina, apamina, histamina, libera potássio dos músculos estriados e eritrócitos, e promove hipotermia e dor intensa, condições suficientes para direta ou indiretamente estimular a liberação de ACTH pela neurohipófise.

Para SELYE seria uma espécie de “stress”, levando a um aumento na produção de ACTH e, conseqüentemente aumento da resposta adrenocortical (appud COUCH & BENTON, 1972).

VICK & SHIPMAN (1972) separaram o VA em oito frações, verificando que apenas o VA integral, a melitina e a apamina produziam aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos, em cães. Após a administração de apamina, a elevação de corticosteróides plasmáticos foi imediata (primeira hora), enquanto que a provocada pela melitina foi lenta e gradual, ultrapassando, porém, os níveis produzidos pela apamina e mantendo-se por 5 horas. Esse autores verificaram, também, que a via de administração que provocava aumentos mais prolongados era a intraperitoneal, provavelmente por entrar mais rapidamente no sistema linfático e, conseqüentemente, na circulação sistêmica.

ZURIER *et alii* (1973) tentaram correlacionar a atividade antiinflamatória do VA sobre a artrite induzida por adjuvante completo de Freund e as alterações nos níveis de corticosteróides em ratos. Injetando VA integral, apamina, melitina e fosfolipase A2 no vigésimo dia da artrite, observaram que o VA integral produzia significativas elevações nos níveis séricos de corticosteróides (primeira hora), enquanto a melitina e a fosfolipase A2 produziam lentas e moderadas elevações. O tratamento com apamina resultou em um aumento gradual e progressivo, atingindo, na quarta hora, níveis comparáveis aos do VA integral.

Para reforçar a idéia da influência da estimulação adrenal na melhora da artrite tratada com VA, esses autores realizaram adrenalectomia verificando que o VA não suprimiu a artrite em animais adrenalectomizados.

### **3.4 Outros prováveis mecanismos de ação do VA como anti-inflamatório**

HADJIPETROU-KOUROUNAKIS & YIANGOU (1984) observaram que o VA não somente suprimia a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, mas que ele afetava o seu desenvolvimento por inibir certas funções dos macrófagos e desse forma, indiretamente a ativação de linfócitos T e B.

Esses autores verificaram que a administração diária do VA, na dose de 500 µg, *s.c.*, por 17 dias, ou picadas de abelhas 3 vezes por semana, por 3 semanas, reduzia significativamente o número de células formadoras de folículos no baço de ratos imunizados com hemáceas de

carneiro, assim como as respostas mitogênicas das células T, sugerindo que o VA afeta direta ou indiretamente certas populações de linfócitos. Esses autores observaram, também, que o VA suprime a produção de Interleucina 1 e Interleucina 2.

Essas observações foram interpretadas como o VA sendo capaz de inibir certas funções dos macrófagos, levando a uma diminuição na produção de Interleucina 1, elementos importantes na patogênese da artrite induzida por adjuvante. Este efeito do VA sobre os macrófagos sugere que a ação do VA na inflamação possa ser devida à interferência em certas funções de algumas células inflamatórias, como foi sugerido por SOMERFIELD (1986). Esse autor mostrou que o VA integral na dose de 2 µg/ml potencialmente inibe a produção de ânions superóxidos pelos neutrófilos, elementos importantes envolvidos na agressão tecidual durante o processo inflamatório. Assim, segundo ele, a terapia local poderia ter um efeito na inflamação inibindo a produção de radicais livres de oxigênio.

#### **4. Objetivos**

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1 Estudar o efeito antiinflamatório do VAA na inflamação aguda induzida por diferentes estímulos flogísticos (Carragenina, Dextrana e Veneno de abelha africanizada).
- 2 Verificar o papel das glândulas adrenais no efeito antiinflamatório do VAA;
- 3 Estabelecer as condições para o desenvolvimento do modelo experimental de artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos Wistar;
- 4 Estudar o efeito antiinflamatório do VAA sobre o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund;
- 5 Demonstrar o efeito antiinflamatório do VAA sobre a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund através do estudo anátomo-patológico.

## **II Materiais e Métodos**

### **1. Animais e Anestesia**

Foram utilizados ratos albinos machos, da linhagem Wistar, com peso variando entre 120 e 150 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração comercial). Para os ratos submetidos à adrenalectomia, além da água, foi oferecida solução salina (0,9%, P/V).

Quando necessário os ratos foram anestesiados com éter etílico em câmara anestésica.

## **2. Obtenção do Veneno de Abelha Africanizada (VAA)**

O Veneno foi obtido de abelhas africanizadas, espécie *Apis mellifera*, doado pelo apiário São José, Valinhos, São Paulo.

O veneno foi sempre extraído do mesmo grupo de colméias e desidratado para a sua utilização. A extração do VAA foi realizada da seguinte maneira: em cada colméia colocou-se sobre a plataforma de pouso, uma placa de vidro munida de fios condutores, conectados a uma bateria. Em seguida, foram feitas, em sequência varável, descargas elétricas de 12 volts. Estas descargas excitavam as abelhas que ali pousavam, fazendo-as picar a placa, depositando então, o veneno sobre a mesma.

Após algum tempo o circuito era desligado, a placa removida e o VAA desidratado, raspado e armazenado em frascos de vidro.

## **3. Modelos de Inflamação**

### **3.1 Inflamação aguda: edema de pata**

O edema de pata foi induzido injetando-se, na região subplantar da pata traseira esquerda, 0,1 ml dos seguintes estímulos inflamatórios: carragenina (Marine Colloids; 50, 100 e 400 ug/pata), dextrana (P.M. de 70000, Sigma; 50, 100, 200 e 400 ug/pata), VAA (4, 20, 100 e 500 ug) e adjuvante completo de Freund (Difco; lot 1392: óleo de parafina + Arlacel A + *Mycobacterium smegmatis* (*butyricum*)).

O edema formado foi avaliado pelo método clássico de pletismografia (WINTER *et alii*, 1962), que consiste na medida, através de um aparelho eletrônico (Ugo Basile, Mod. 7150), do volume deslocado após imersão da pata em um reservatório contendo líquido apropriado.

Os resultados foram expressos como a variação, em ml, entre o volume final (volume medido em tempos diferentes após a injeção do estímulo flogístico) e o volume inicial da pata traseira esquerda (volume medido antes da injeção do estímulo).

Após a injeção da carragenina e dextrana as medidas dos volumes das patas foram realizadas na primeira, segunda, terceira e quarta horas. No caso do VAA foram medidos os volumes das patas nos trinta minutos, primeira, segunda, terceira e quarta horas.

## **3.2 Inflamação crônica: modelo de artrite experimental induzida pelo adjuvante completo de Freund**

### **3.2.1 Curso Temporal e quadro clínico**

O modelo utilizado foi baseado no descrito por TAUROG *et alii* (1988). Injetou-se 0,1 ml de adjuvante completo de Freund na região sub plantar da pata traseira esquerda de cada animal, usando-se uma seringa tuberculina e agulhas hipodérmicas 13x4.

Mediu-se o volume da pata traseira esquerda após a injeção do adjuvante, diariamente, sempre no período vespertino, até o vigésimo segundo dia. Os valores dos volumes obtidos representaram a diferença entre o volume da pata de cada dia e o volume inicial (volume antes da injeção do adjuvante).

A avaliação da artrite foi feita, também, pela observação rotineira do quadro clínico apresentado pelos ratos (poliartrite, nódulos subcutâneos nas orelhas e cauda e balanite), que se tornou bastante evidente a partir do décimo quinto dia após a injeção do adjuvante e através do estudo anatomo-patológico das articulações mais acometidas, quais sejam, as articulações tibiotársicas e metatarso-falangeanas.

### **3.2.2 Avaliação histopatológica**

O estudo anátomo-patológico foi realizado no 15º dia da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, nos grupos de animais tratados profilaticamente ou não com VAA ou dexametasona, e obedeceu às seguintes normas: as articulações tibiotársicas e metatarsofalangeanas das patas direita e esquerda de todos os animais dos grupos foram retiradas e colocadas em formalina a 10%. Para efetuar o processo de descalcificação, permaneceram em uma solução de Citrato de Sódio a 20% (65 ml) e Ácido Fórmico 90% (35 ml), por quarenta e oito horas, e, em seguida, foram então, cortadas e incluídas em parafina para a secção por micrótomo em fragmentos de 6 micrômetros de espessura. Após, os cortes foram corados por Hematoxilina-eosina e montados entre lâmina e lamínula para a observação microscópica.

Os cortes histológicos foram feitos nos sentidos longitudinal e transversal. Foram realizados, em média, dois cortes histológicos por articulação. A análise foi feita de forma aleatória em pelo menos dois cortes, de oito possíveis (2 articulações; 2 cortes por articulação; 2 patas traseiras), por animal.

Para compormos o quadro anátomo-patológico, que expressa as alterações próprias da artrite por adjuvante completo de Freund, foram estudadas:

- 1 Presença e intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear (M; linfócitos, plasmócitos e macrófagos) em:
  - a. tecido periarticular (P.A.)
  - b. sinóvia (S)
  - c. pannus (P)
  - d. tecido periosteal (P.O.)
- 2 Granulomas epitelióides (G.E.) em:
  - a. tecido periarticular
  - b. sinóvia
- 3 Granulomas adiposos (G.A.) em:
  - a. tecido periarticular
- 4 Microabcessos (M.A.) em:
  - a. tecido periarticular
- 5 Formação de pannus (P)
- 6 Destruição cartilaginosa (D.C.)
- 7 Regeneração óssea (R.O.) cortical e justa articular

A presença em termos de frequência de aparecimento, do infiltrado inflamatório mononuclear foi avaliada em cada uma das regiões anatômicas anteriormente descritas. A sua intensidade foi medida segundo critério semi-quantitativo (em cruces) de acordo com: 0 = ausência; + = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso. Os resultados foram expressos para cada região como mediana dos valores obtidos por grupo.

## **4. Efeito antiinflamatório do VAA**

### **4.1 Modelo de inflamação aguda**

#### **4.1.1 Animais normais**

O VAA (20,100 e 500 µg) foi administrado, s.c., 30 minutos antes da administração de carragenina (Cg: 200 µg), dextrana (Dxt: 200 µg) e VAA (100 µg). Os grupos controles receberam 1 ml de solução salina. O efeito antiinflamatório do VAA foi avaliado nos tempos de máxima reação inflamatória, determinados anteriormente a partir dos estudos do

curso temporal para cada estímulo inflamatório. Assim, para a Cg foi na quarta hora, para a Dxt, na primeira hora e para o VAA, nos primeiros trinta minutos.

O efeito deste tratamento foi comparado com aquele obtido com a utilização de dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c.), uma hora antes dos estímulos.

#### **4.1.2 Animais adrenalectomizados**

A adrenalectomia bilateral foi realizada cirurgicamente, em animais anestesiados, através de dois cortes ( 1 cm) na região lombar, logo abaixo do rebordo costal.

Animais falso operados foram submetidos ao mesmo estresse cirúrgico, sem a remoção das adrenais.

Os animais foram utilizados uma semana após a cirurgia. Foram excluídos do estudo aqueles que apresentavam sinais clínicos de debilidade, presença de inflamação na região cirúrgica e, no caso dos animais adrenalectomizados, aqueles que apresentavam resquícios da glândula, por laparotomia exploratória, ao final dos experimentos.

Os dois grupos, adrenalectomizados e falso operados, foram tratados, s.c., com 500 µg de VAA, 30 minutos antes da administração dos mesmos estímulos flogísticos descritos no item 4.1.

### **4.2 Modelo de Inflamação crônica**

Para avaliar o efeito antiinflamatório do VAA na artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund foram utilizados dois modelos experimentais baseados nos trabalhos de LORENZETTI *et alii* (1972) e CHANG & BLIVEN (1979):

#### **4.2.1 Regime profilático**

No regime profilático o VAA (500 µg, s.c.) foi injetado nos seguintes grupos de animais:

- a) tratados quinze dias antes da injeção do adjuvante, com VAA três vezes por semana (às segundas, quartas e sexta-feiras), no período vespertino, num total de seis doses;
- b) em regime de doses únicas tratados 30 minutos ou 24 horas antes do adjuvante.

O efeito desses tratamentos foi comparado com o obtido com a utilização de dexametasona (0,5 mg/Kg) administrada seguindo os mesmos protocolos. Os grupos controles receberam solução salina 0,9%.

Foram realizadas medidas dos volumes das patas traseiras esquerdas das patas antes e no décimo quinto dia após a injeção do adjuvante, quando a artrite já estava clinicamente estabelecida.

Além do volume da pata, para a avaliação do efeito antiinflamatório do VAA, também foram considerados o quadro clínico e o estudo anátomo-patológico das articulações.

#### **4.2.2 Regime terapêutico**

O regime terapêutico se caracterizou pela administração do VAA, *s.c.*, na dose de 500 µg, a partir do décimo sétimo dia após a injeção do adjuvante.

Foram administradas doses diárias de VAA, no período vespertino, durante sete dias consecutivos. O efeito antiinflamatório do VAA foi comparado com o obtido com a dexametasona (0,5 mg/Kg, *s.c.*, no dorso). Os grupos controles receberam solução salina 0,9%. Foram realizadas medidas do volume das patas traseiras esquerdas dos animais antes e do décimo sétimo ao vigésimo segundo dia, após a administração do adjuvante.

### **5. Análise Estatística**

Aos resultados obtidos foram aplicados tratamentos estatísticos para determinação das médias e dos erros padrões das médias (E.P.M.). Para comparações entre grupos, os seguintes testes estatísticos foram utilizados para determinação dos índices de significância ( $p < 0,05$ ):

- a) análise de variância “one way” (ANOVA), para comparação múltipla de variáveis independentes;
- b) nos casos em que os valores de F obtidos foram maiores que F 0,05 crítico, a comparação para determinação de diferenças estatisticamente significativas foi feita utilizando-se o teste de Duncan;
- c) o teste “t” de Student para amostras não pareadas.

No caso do regime terapêutico, o cálculo da área sobre as curvas obtidas com o grupo controle e com os tratamentos com VAA e dexametasona entre 17° e o 22° dia, foi feito pelo método trapesimal utilizando-se o programa de computação Pharmacological Calculation System - version 4.2 (A). As comparações estatísticas entre as médias das áreas foram feitas por análise de variância e teste de DUNCAN.

No estudo anátomo-patológico, por ter envolvido critérios semi-quantitativos, foram feitos tratamentos estatísticos para determinação dos valores mínimo, máximo e da mediana (DUNCAN, 1955; KRAMER, 1956; SNEDECOR, 1963).

## **III Resultados**

### **1. Inflamação aguda: Edema de pata**

#### **1.1 Curso temporal e curva dose-resposta do edema de pata induzido pela carragenina (figura 1)**

Verificou-se após a injeção de Cg (200 $\mu$ g/rato) na região subplantar da pata traseira esquerda dos ratos, um aumento progressivo do volume da pata injetada com um pico máximo de reação inflamatória entre a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> horas. (figura 1-A). Esses aumentos foram dose-dependentes, chegando a atingir com a dose de 200 $\mu$ g/rato o dobro do volume da pata em relação à dose de 50 $\mu$ g (figura 1-B).

## **1.2 Curso temporal e curva dose-resposta do edema de pata induzido pela dextrana (figura 2)**

Após a injeção de dextrana (100 $\mu$ g) na região subplantar da pata traseira esquerda de ratos, observou-se aumento progressivo do volume da pata injetada, com um pico máximo de reação inflamatória na 1<sup>a</sup> hora, decaindo a partir da 3<sup>a</sup> hora. (figura 2-A). Esse aumento também se mostrou dose-dependente. (figura 2-B).

## **1.3 Curso temporal e curva dose resposta do edema de pata induzido pelo VAA (figura 3)**

Observou-se, após a injeção de VAA (100 $\mu$ g/rato) na região subplantar da pata traseira esquerda dos ratos, um aumento imediato e progressivo do volume da pata injetada, que atingiu o pico máximo de reação aos 30 minutos. (figura 3-A). Esse aumento mostrou-se dose-dependente, atingindo com a dose de 500 $\mu$ g/rato valores de edema elevados (cerca de 1 ml; figura 3-B)

# **2. Efeito Antiinflamatório do VAA no Modelo de Inflamação Aguda**

## **2.1 Ratos normais**

Verificamos que o VAA apresentou potente efeito antiinflamatório, estatisticamente significativo, sobre o edema de pata induzido pelos estímulos flogísticos carragenina (Cg), dextrana (Dxt) e veneno de abelha africanizada (VAA) (figura 4).

### **2.1.1 Carragenina**

O efeito antiinflamatório do VAA sobre o edema de pata induzido pela carragenina se mostrou dose-dependente chegando a 59% de inibição na dose de 500 $\mu$ g.

### **2.1.2 Dextrana**

Verificou-se que o VAA apresentou efeito antiinflamatório, sobre o edema de pata induzida pela Dextrana, que já se mostrou máximo com a dose de 20  $\mu$ g, atingindo cerca de 44% de inibição.

### **2.1.3 VAA**

O efeito antiinflamatório do VAA sobre o edema de pata induzido pelo próprio VAA foi dose-dependente, com cerca de 30% de inibição na dose de 500 $\mu$ g de VAA.

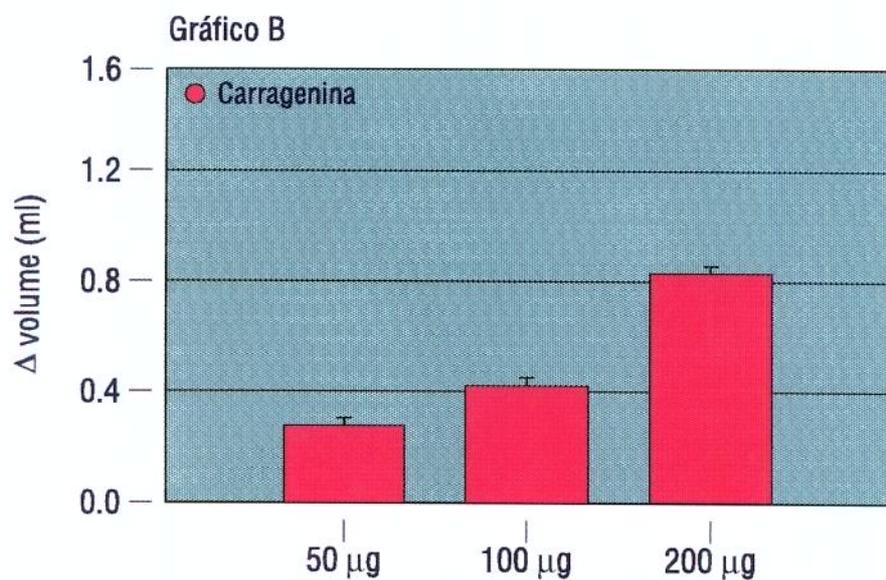
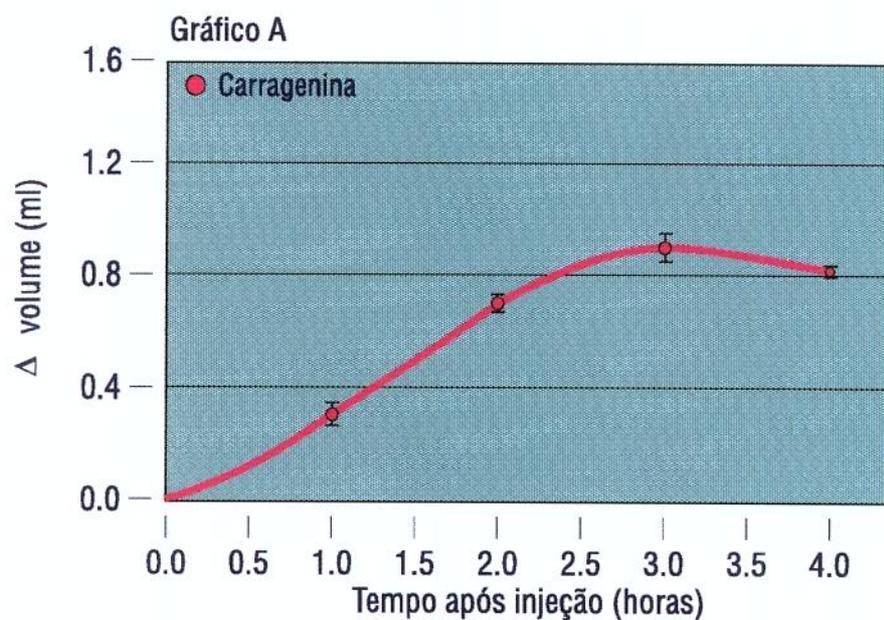


Figura 1 - **Edema de pata em ratos induzido pela carragenina.** A: curso temporal do edema induzido por 200  $\mu\text{g}$  de carragenina. B: curva dose-resposta da carragenina, realizada na 4ª hora após a injeção. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados foi de 5 para cada dose.

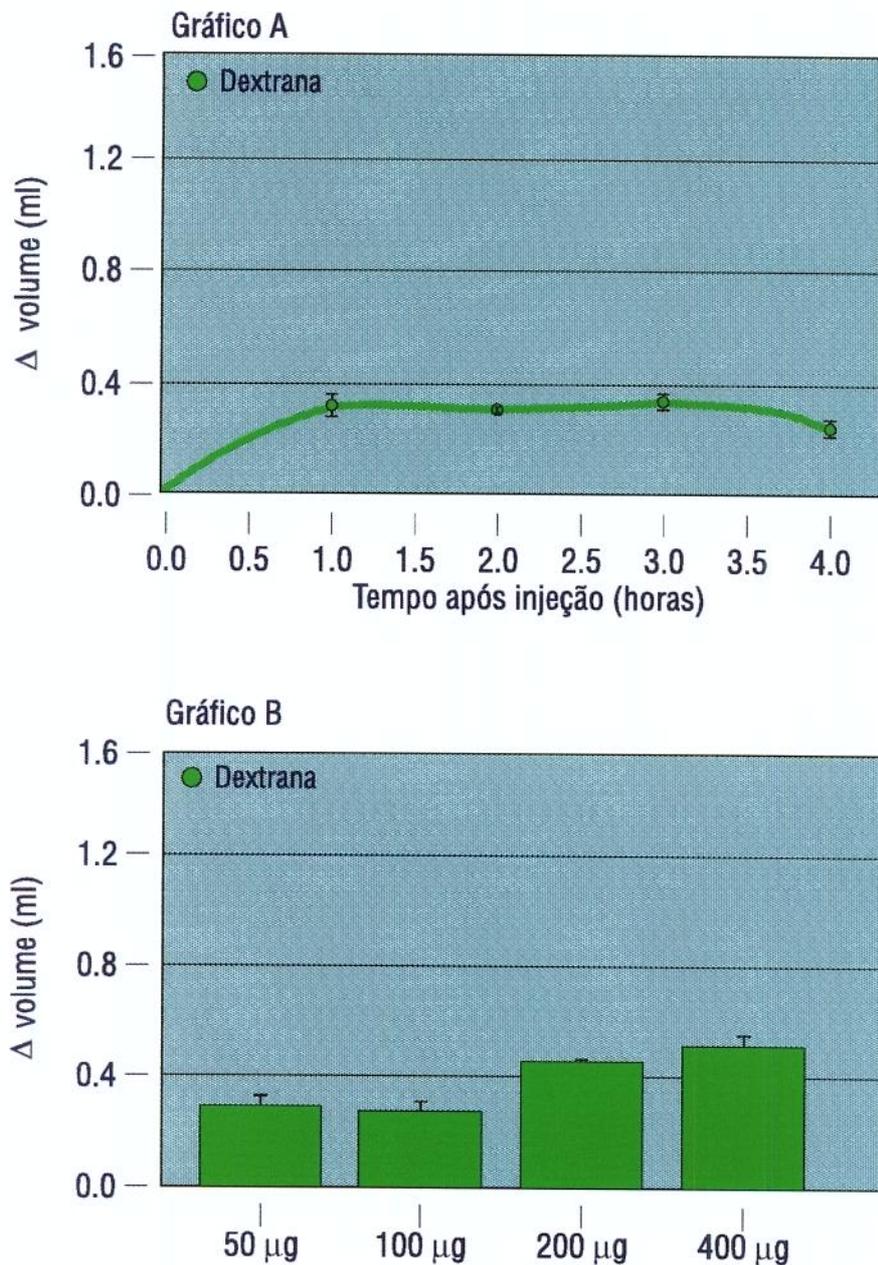


Figura 2 - **Edema de pata em ratos induzido pela dextrana.** A: curso temporal do edema induzido por 100 µg de dextrana. B: curva dose-resposta de dextrana realizada na 1<sup>a</sup> hora após a injeção de dextrana. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados foi de 5 para cada dose.

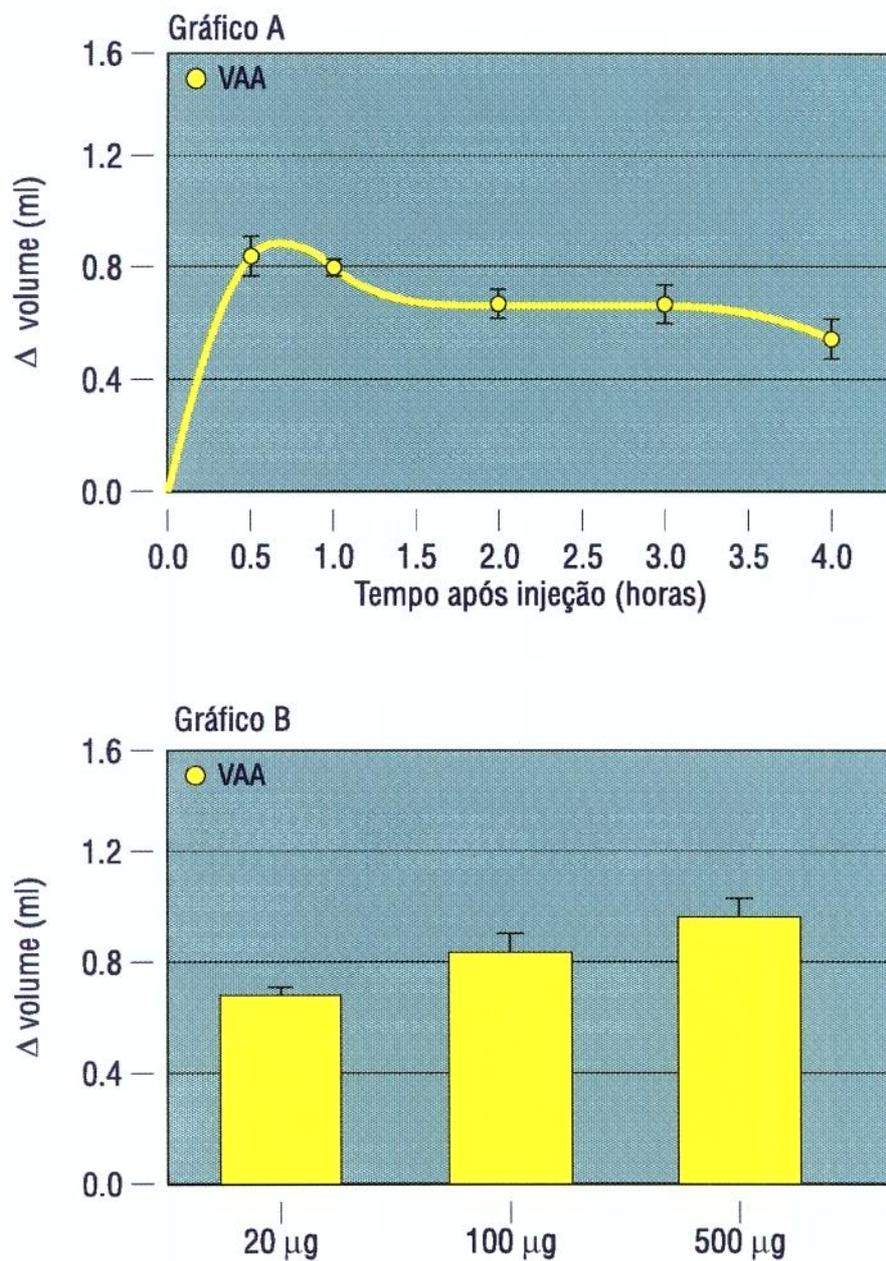


Figura 3 - Edema de pata em ratos induzido pelo veneno de abelha africanizada (VAA). A: curso temporal do edema induzido por 100  $\mu\text{g}$  de VAA. B: curva dose-resposta do VAA, realizado aos 30 minutos após a injeção do VAA. Resultados apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados foi de 5-10 para cada dose.

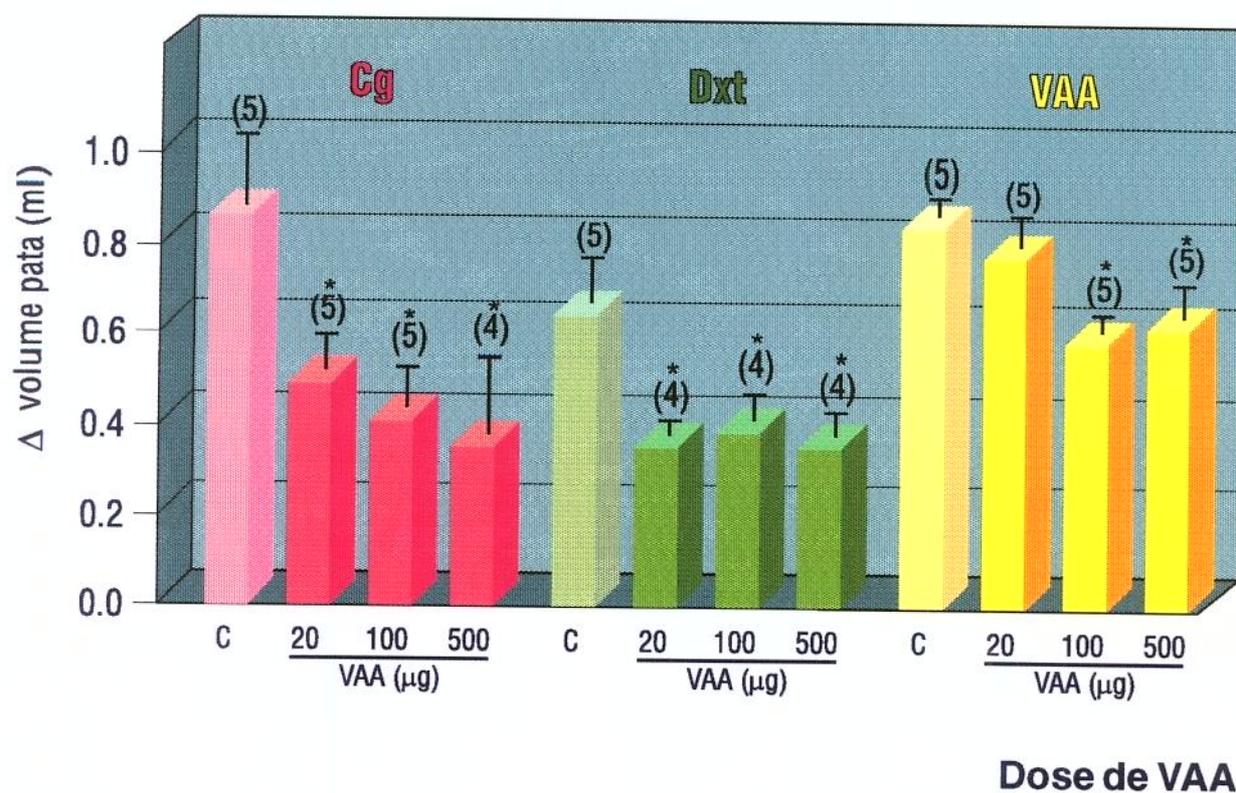


Figura 4 - Efeito antiinflamatório do veneno de abelha africanizada (VAA) sobre o edema de pata em ratos induzido pela carragenina (Cg, 200 µg), dextrana (Dxt, 100 µg) e VAA (100 µg). O VAA (20, 100 e 500 µg) foi injetado s.c., 30 minutos antes da injeção dos estímulos. A reação edematogênica foi avaliada na 4ª hora para a Cg., na 1ª hora para a Dxt e aos 30 minutos para o VAA. Resultados apresentados como média ± EPM. Os números entre parênteses indicam o número de animais utilizados. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle (C). (ANOVA; teste de DUNCAN).

## **2.2 Ratos adrenalectomizados**

Verificou-se acentuada inibição do efeito antiinflamatório do VAA, sobre o edema de pata, induzido pela carragenina, dextrana e o VAA nos animais adrenalectomizados, estatisticamente significativa, quando comparado com animais falso operados. (figura 5). Observou-se que em relação ao edema de pata induzido pela carragenina e dextrana, o VAA manteve seu efeito antiinflamatório em torno de apenas 18% e para o edema induzido pelo próprio VAA em cerca de 12%.

## **3. Inflamação Crônica**

### **3.1 Curso temporal do desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund e quadro clínico**

Neste trabalho verificou-se que a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund se apresentou como um fenômeno bifásico, com o primeiro pico de reação evidenciado pelo aumento do volume da pata injetada, ocorrendo entre o 4º e 5º dia e o segundo pico, variando entre o 10º e 15º dias. (figura 6). A partir do segundo pico de reação, isto é, entre 10º e 15º dia após a injeção do adjuvante, os ratos apresentaram quadro clínico caracterizado por poliartrite, nódulos subcutâneos nas orelhas e caudas, balanite e visível perda de peso (figura 7).

A poliartrite caracterizou-se pelo acometimento, principalmente na pata injetada, da articulação tibiotársica que atingiu o aumento de duas a três vezes o volume normal e as articulações metatarso-falangeanas. As articulações inter-falangeanas proximais apresentaram também aumentos fusiformes observando-se acentuada restrição da movimentação das patas (figura 8).

### **3.2 Histopatologia**

O estudo anátomo-patológico das articulações tibio-társicas das patas traseiras, foi realizado no segundo pico de reação da artrite, e evidenciou os seguintes achados:

- 1 Presença de infiltrado de células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos nas seguintes regiões:
  - a. tecido periarticular (figura 9-A)
  - b. sinóvia
  - c. tecido periosteal
- 2 Presença de granulomas epitelióides no tecido periarticular e subcutâneo, caracterizado pelo acúmulo de células epitelióides (macrófagos) com ou sem gigantócitos. (figura 9-B).

- 3 Presença de granulomas adiposos (acúmulo de células adiposas) no tecido periarticular.
- 4 Formação de microabscessos (figura 10)
- 5 Formação de pannus (figura 11)
- 6 Regeneração óssea e periostite (figura 12)

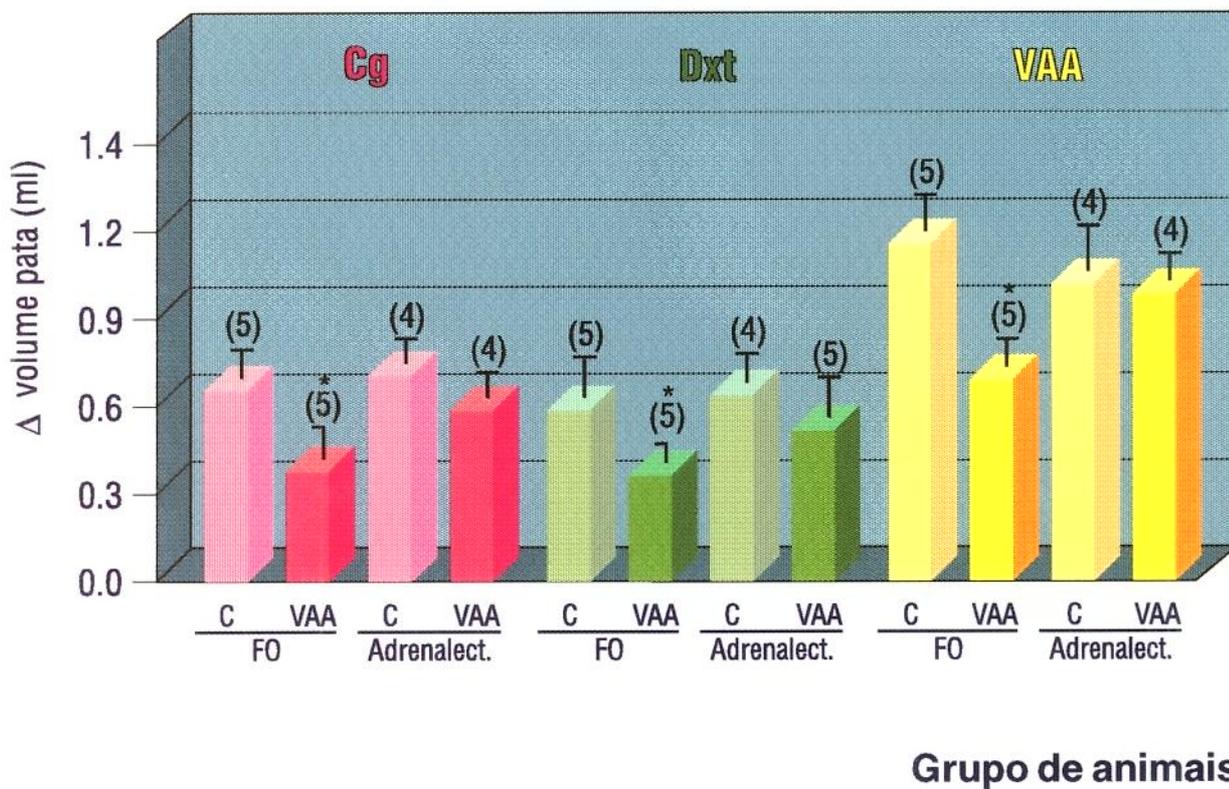


Figura 5 - Inibição do efeito antiinflamatório do veneno de abelha africanizada (VAA), em animais adrenalectomizados, sobre o edema de pata induzido pela Carragenina (Cg, 200 µg), dextrana (Dxt, 100 µg) e VAA (100 µg). Os animais foram submetidos à adrenalectomia ou ao estresse cirúrgico (falso-operados, FO) uma semana antes da injeção dos estímulos. O VAA (500 µg) foi injetado s.c., 30 minutos antes da injeção dos estímulos. A reação edematogênica foi avaliada na 4ª hora para a Cg, na 1ª hora para a Dxt e aos 30 minutos para o VAA. Resultados apresentados como média ± EPM. Os números entre parênteses indicam o número de animais utilizados. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle (C). (test “t” de student).

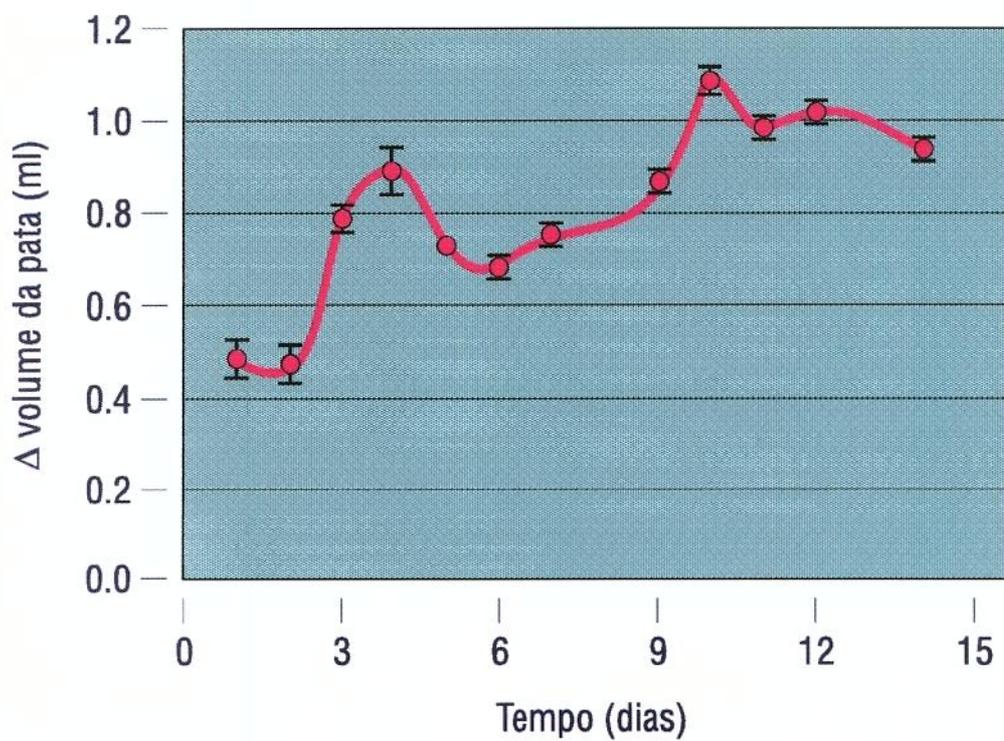


Figura 6 - **Curso temporal do desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund.** Resultados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de 3 experimentos de 6 animais em cada um.

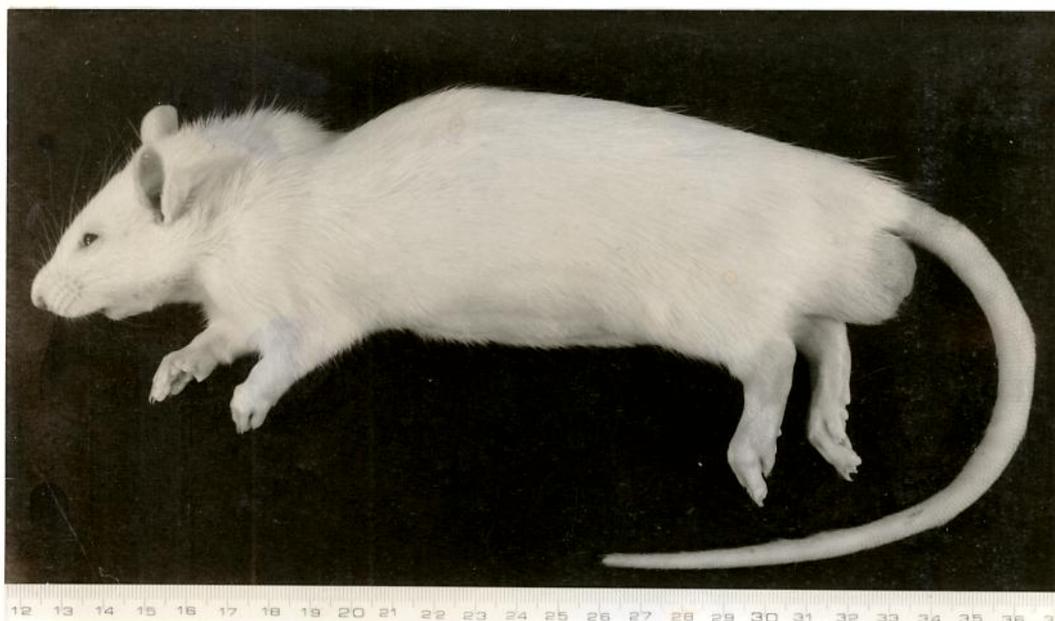


Figura 7 - Aspectos macroscópicos de um rato com artrite induzida por adjuvante completo de Freund no 15º dia após a injeção do adjuvante. Observar o aumento fusiforme do volume das articulações tibiotársicas, metatarso-falangeanas e interfalangeanas proximais; nódulos subcutâneos na cauda e balanite.

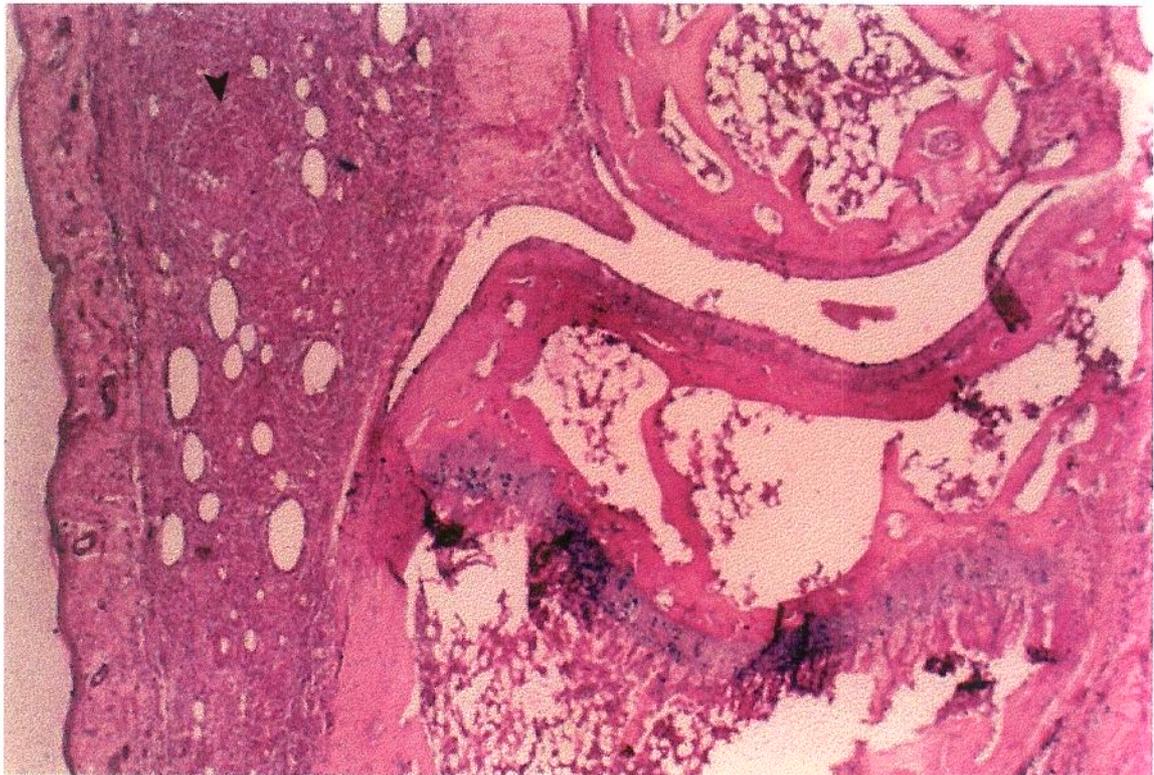


A

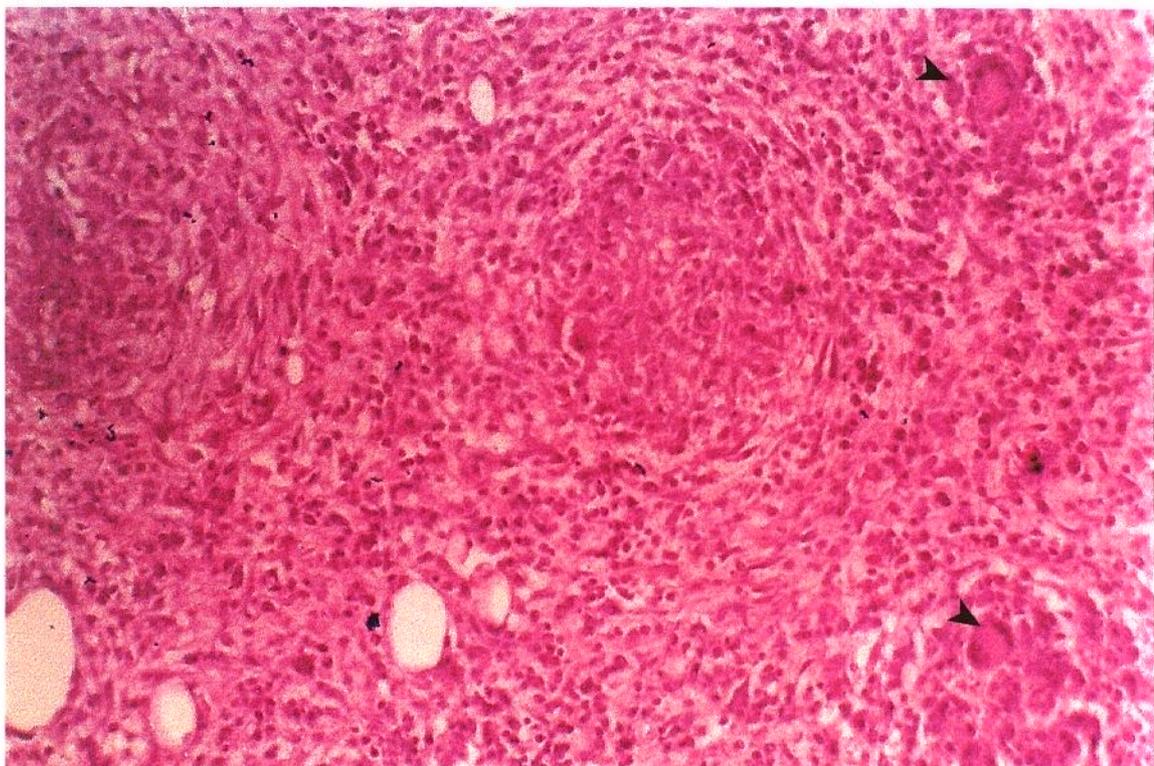


B

Figura 8 - Detalhes de aspectos macroscópicos da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos (15º dia após a injeção do adjuvante) (A): poliartrite caracterizada pelo aumento difuso do volume das articulações tibiotársicas e metatarso-falangeanas com típica flexão e edema fusiforme das articulações interfalangeanas proximais; nódulos subcutâneos na cauda; (B): observar o aumento das articulações interfalangeanas e nódulos subcutâneos nas orelhas.



(A)



(B)

Figura 9 - Aspecto histopatológico da articulação tibiotársica de ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund no 15º dia. (A): observar a presença de infiltrado mononuclear e granuloma epitelióide (seta) em tecido subcutâneo (73x). (B): detalhe dos granulomas epitelióides com células gigantes (seta) e do infiltrado de células mononucleares (132x) Hematoxilina-eosina.

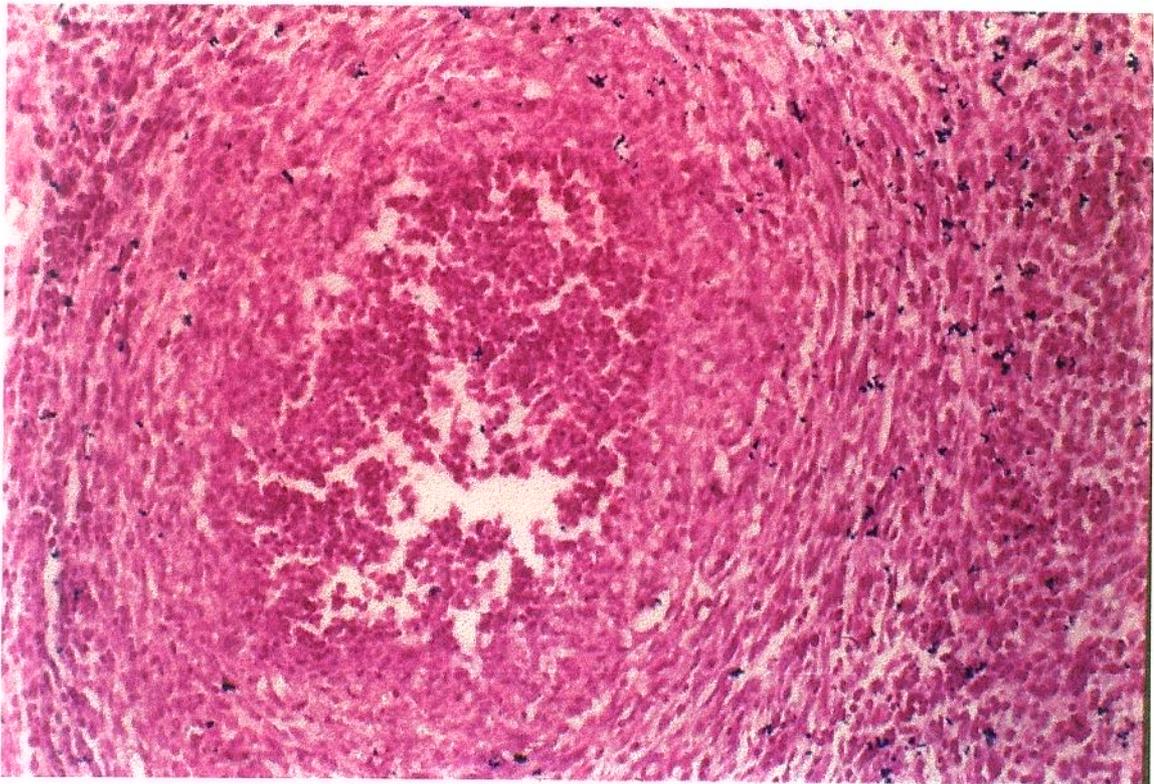


Figura 10 - **Aspecto histopatológico da articulação tibiotársica de ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund no 15º dia. Observar a presença de microabscessos no tecido subcutâneo (132x) Hematoxilina-eosina.**

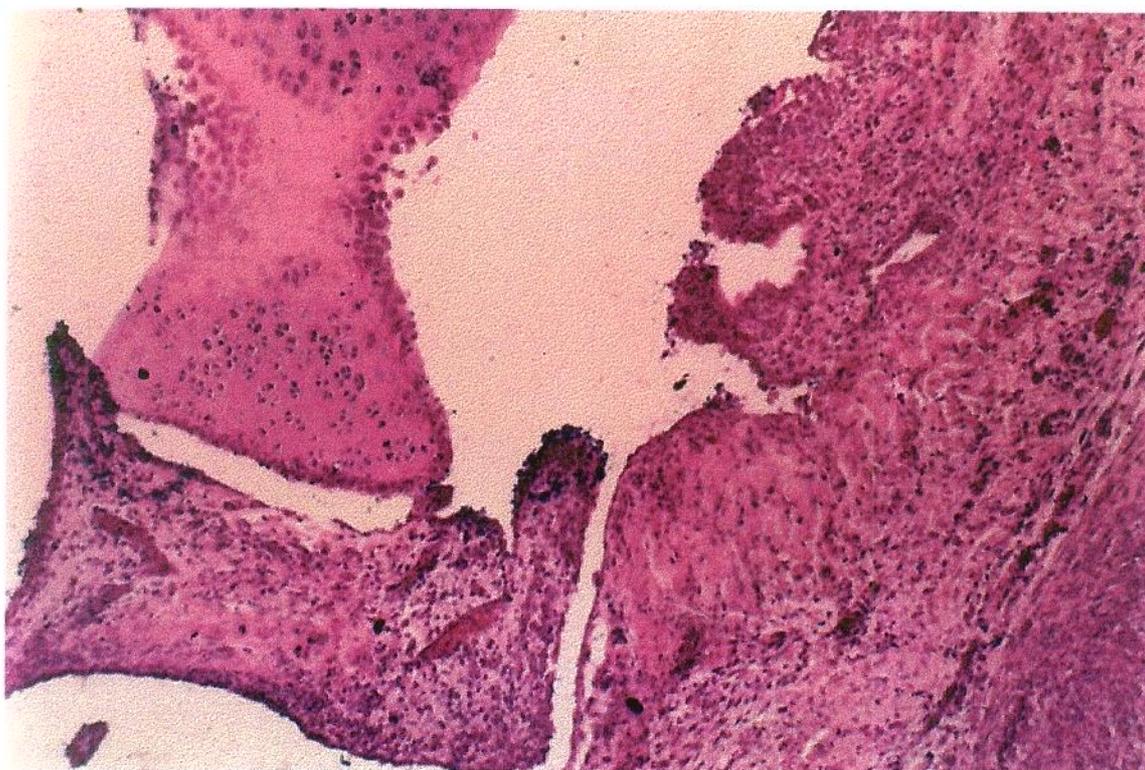
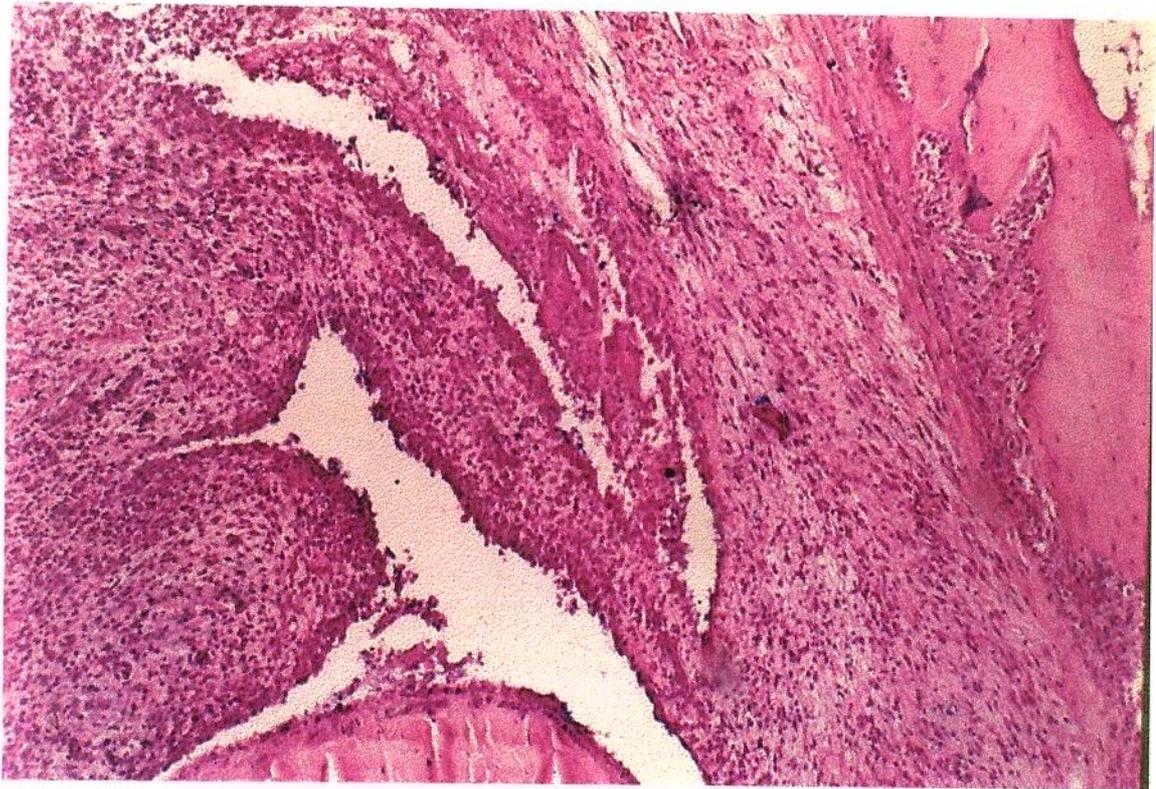
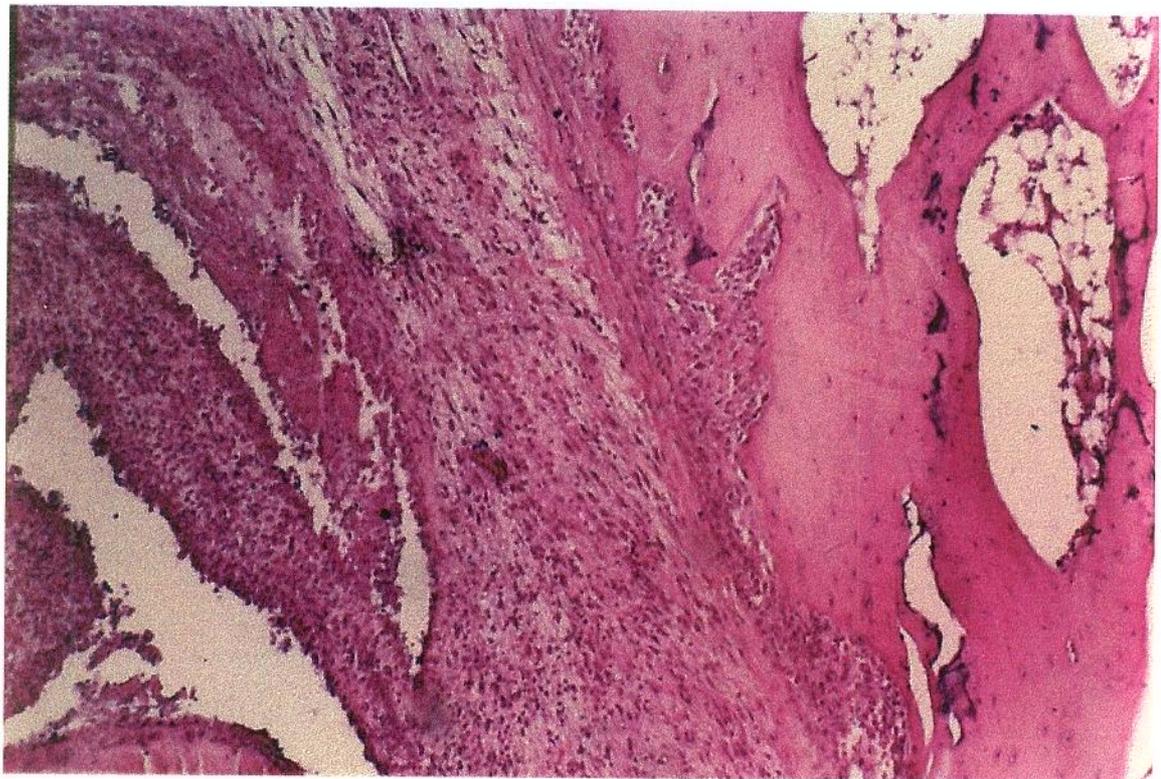


Figura 11 - **Aspecto histopatológico da articulação tibiotársica de ratos com artrite induzida pelo adjuvante de Freund no 15º dia. Observar a formação de pannus (73x) Hematoxilina-eosina.**



(A)



(B)

Figura 12 - **Aspecto histopatológico da articulação tibiotársica de ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund no 15º dia.** (A): sinovite (S) com pannus (P) junto ao tendão e regeneração óssea (73x). (B): em detalhe observar a riqueza de osteoblastos para regeneração de área destruída pelo processo inflamatório (73x) Hematoxilina-eosina.

## 4. Efeito antiinflamatório do VAA sobre a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund

### 4.1 Regime Profilático

Verificou-se que o VAA (dose única, 500µg/rato, s.c.); quando administrado 24 horas ou 30 minutos antes da injeção do adjuvante completo de Freund, não inibiu o aparecimento da artrite. (tabela 2). A dexametasona, nas mesmas condições, também não foi capaz de alterar o desenvolvimento da artrite.

Por outro lado, quando o VAA foi administrado 15 dias antes do adjuvante, 500µg, s.c., no total de 6 doses, causou uma inibição, estatisticamente significativa, da artrite em cerca de 45%, semelhante a provocada pela dexametasona (figura 13). Clinicamente, os ratos apresentam menos nódulos subcutâneos nas orelhas e caudas, assim como menor balanite e perda de peso, comparativamente, ao grupo controle.

O estudo anátomo-patológico das articulações tibiotársicas das patas traseiras dos grupos tratados com VAA e dexametasona mostraram, em relação ao grupo controle, diferenças acentuadas, quais sejam, diminuição do infiltrado de células mononucleares em tecido periarticular, periosteal e sinóvia, bem como ausência de granulomas epitelióides e adiposos, raros microabscessos e praticamente ausência da formação de pannus, e regeneração óssea (figura 14 a 18).

**Tabela 2 - O tratamento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos com VAA (500 µg, s.c) 30 minutos e 24 horas antes da injeção do adjuvante não inibiu a artrite (15º dia).**

Grupo	Volume da pata	(n)
Controle	0.82 ± 0.07	12
VAA 30 min.	0.99 ± 0.08	6
VAA 24 horas	0.69 ± 0.07	6
DEX 30 min.	1.20 ± 0.11 (*)	5
Dex 24 horas	0.65 ± 0.07	6

Resultados como média, ± E.P.M. de (n).

(\*) p<0,05 (ANOVA; Teste de Duncan), em relação a controle.

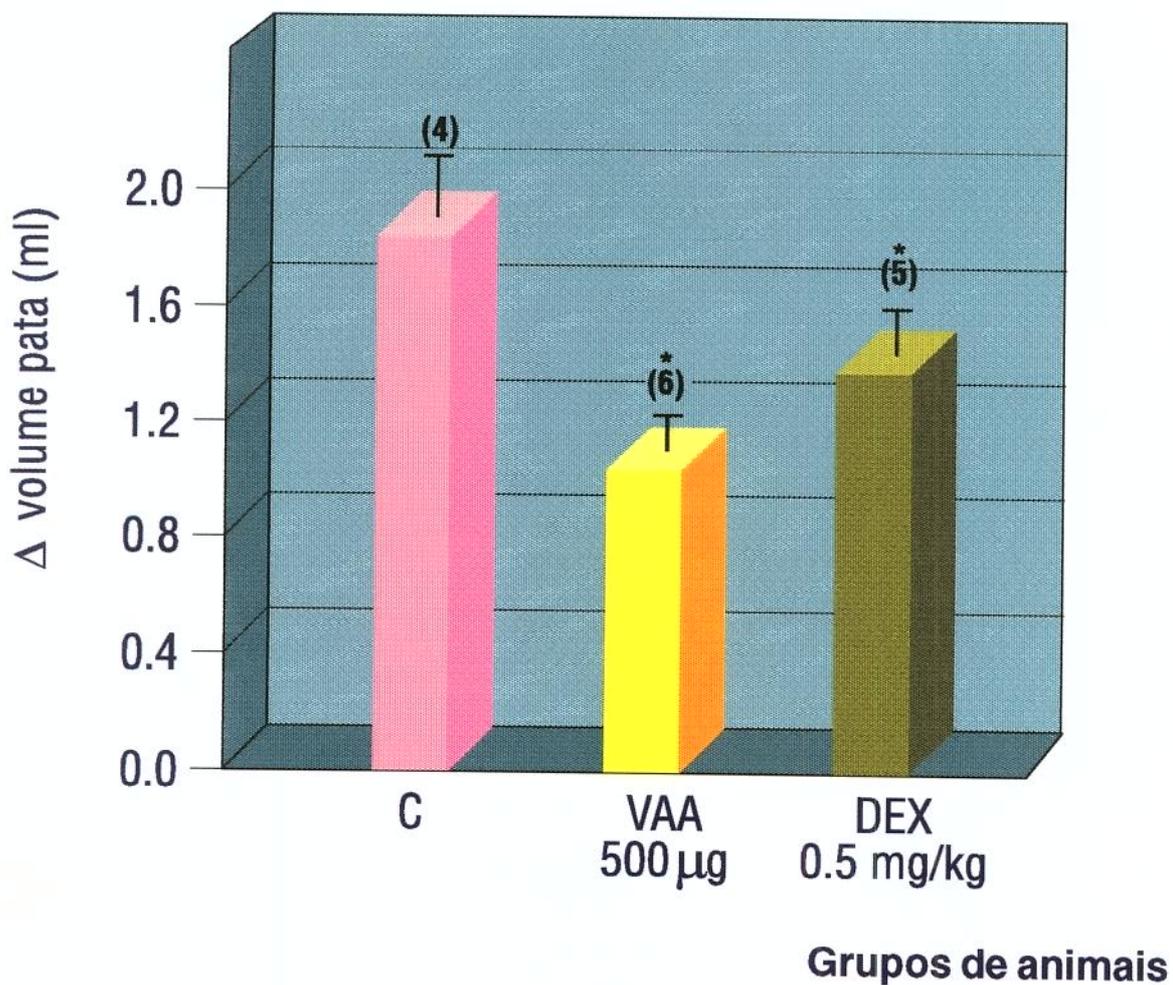


Figura 13 - Redução da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund pelo tratamento profilático com o veneno de abelha africanizada (VAA) e dexametasona (Dex). Os animais foram tratados 2 semanas antes da indução da artrite e o efeito antiinflamatório avaliado no 15º dia após a injeção do adjuvante. Resultados apresentados como média ± EPM. Os números entre parênteses indicam o número de animais utilizados. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle (C). (ANOVA; teste de DUNCAN).

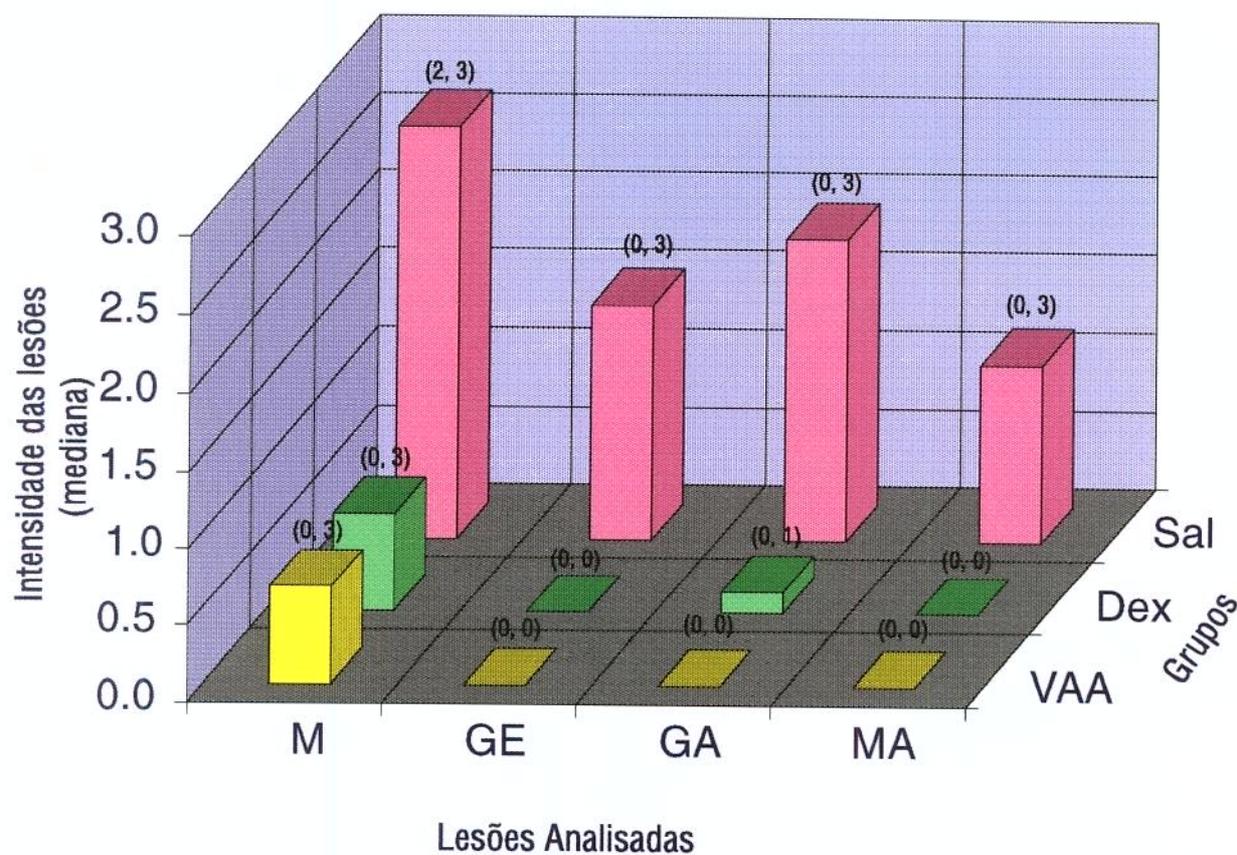


Figura 14 - **Inibição do desenvolvimento de alterações histopatológicas características da artrite induzida por adjuvante completo de Freund, em ratos, pelo tratamento profilático com VAA (500 mg; s.c.) e Dex (0,5 mg/Kg; s.c.).** As alterações analisadas foram; M = infiltrado mononuclear; GE = granuloma epitelióide; GA = granuloma adiposo; MA = microabcesso. As regiões estudadas estão referidas na figura. Os resultados expressam a mediana dos valores das intensidades das lesões (0 a +++) de pelo menos 11 lâminas estudadas por grupo. Os números entre parênteses, acima de cada coluna representam o maior e o menor valor de cada alteração.

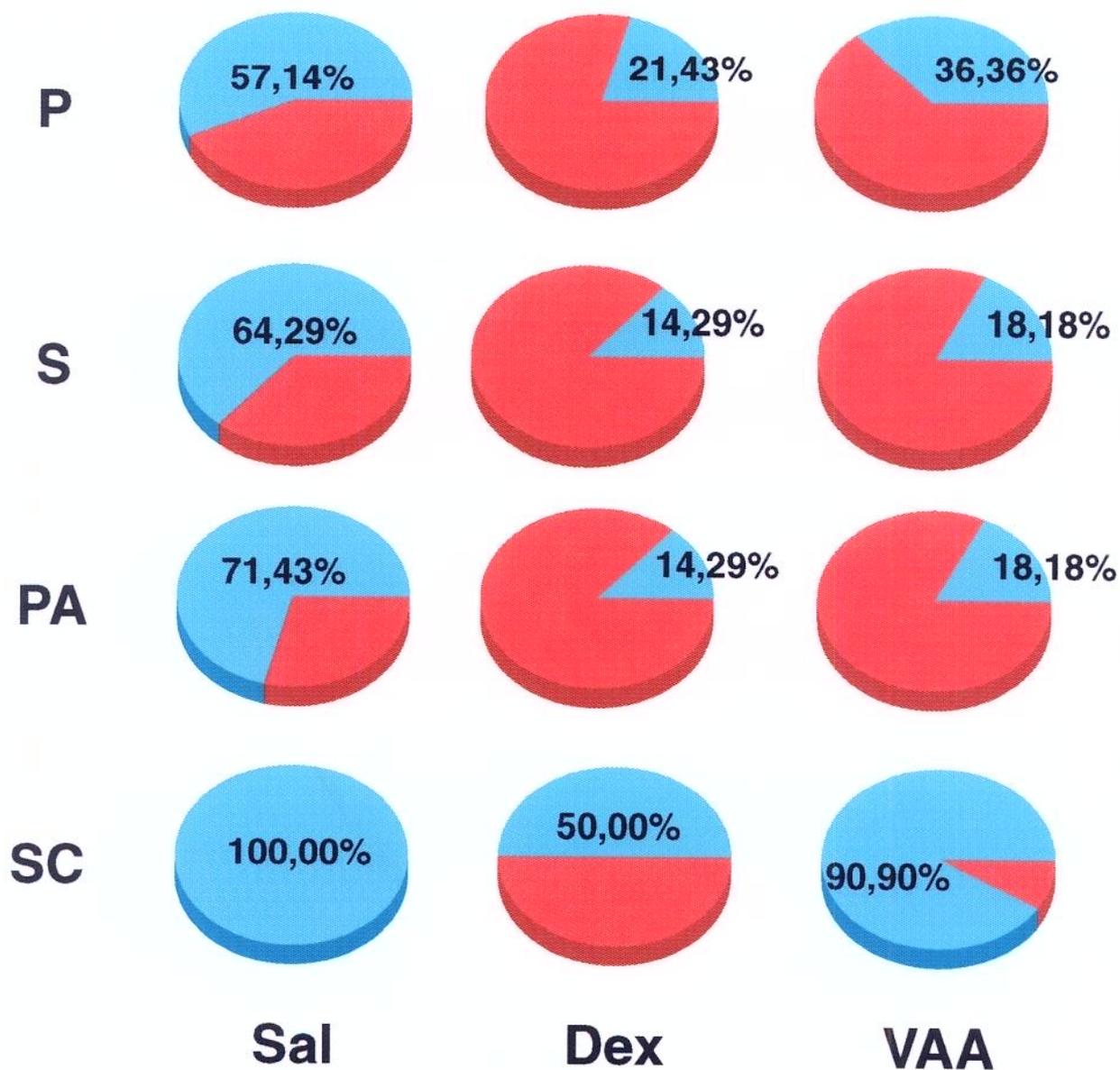


Figura 15 - Representação da distribuição da freqüência de aparecimento (em porcentagem) do infiltrado mononuclear (M) nas diversas regiões após o tratamento profilático, 15 dias antes, com veneno de abelha africanizada (VAA, 500 mg, s.c.) e dexametasona (Dex, 0,5 mg/Kg, s.c.), dos ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (15º dia). A área de cor azul representa a presença da lesão. SC - sub-cutâneo; PA - periarticular; S - sinóvia; P - pannus

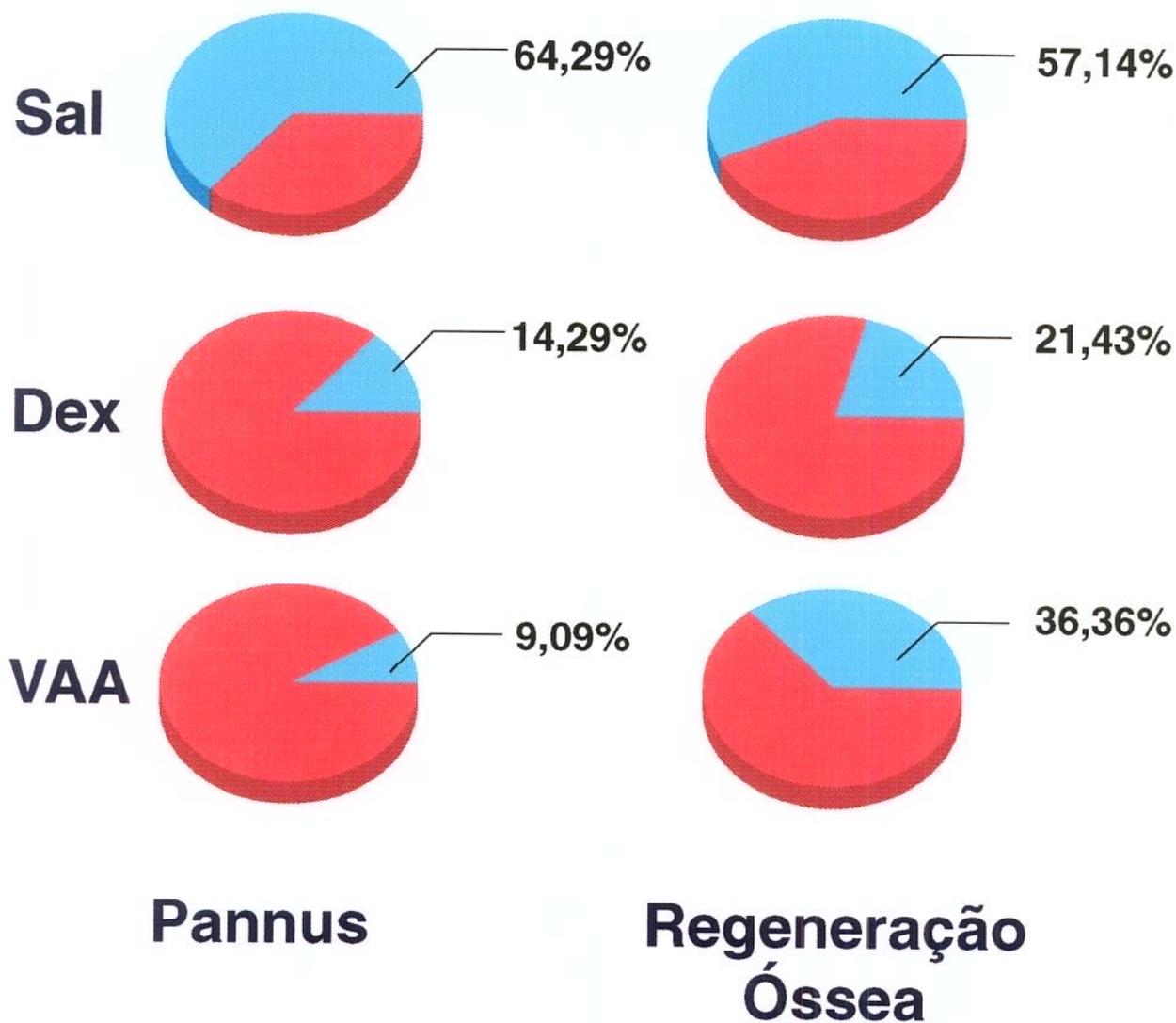
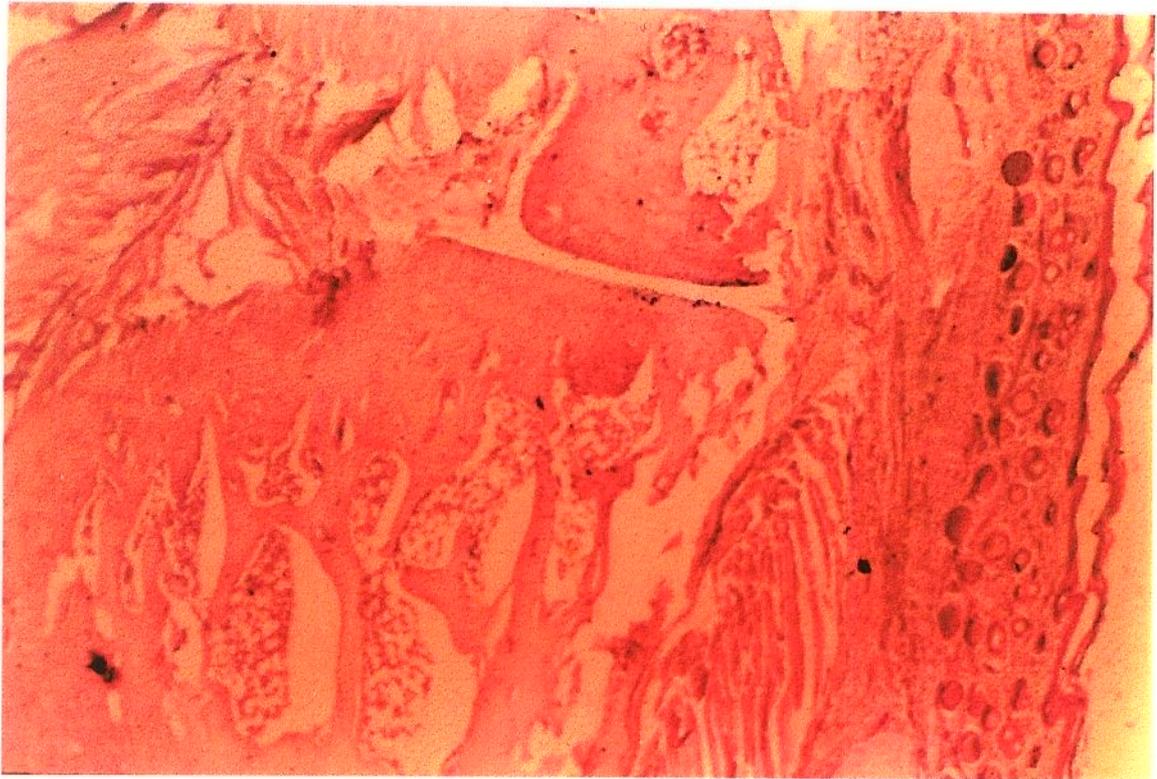
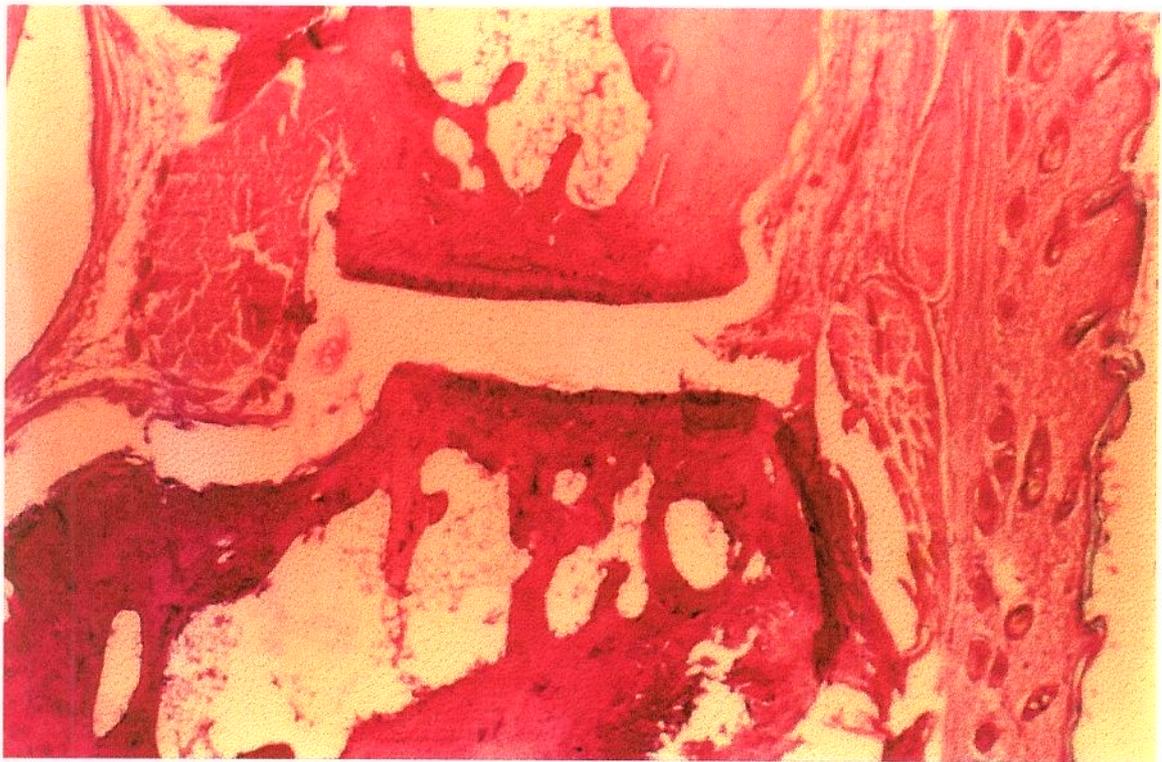


Figura 16 - Representação da distribuição da freqüência do pannus (P) e regeneração óssea (R.O.) após o tratamento profilático 15 dias antes, com veneno de abelha africanizada (VAA, 500 µg, s.c.) e dexametasona (Dex, 0,5 µg/Kg, s.c.), dos ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (15º dia). A área de cor azul representa a presença de lesão.



(A)



(B)

Figura 17 - Aspectos histopatológicos da articulação tibiotársica de ratos com artrite induzida pelo adjuvante de Freund (15º dia pré-tratados com VAA (A), 500 $\mu$ g ou Dexam., 0,5  $\mu$ g (B): Observar em ambos, tecidos subcutâneo e superfície articular normais (73x).

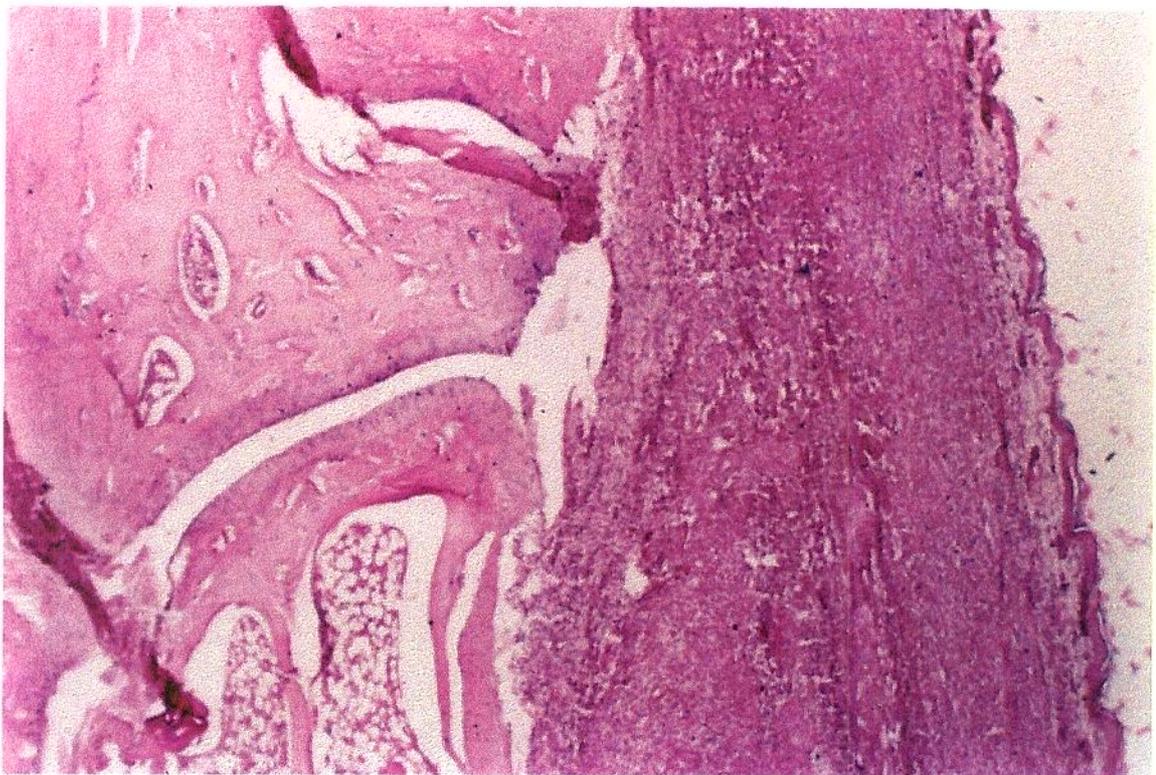


Figura 18 - Aspectos histopatológicos da articulação de ratos com artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund pré-tratados com VAA (500 $\mu$ g). Observar a presença de infiltrado celular no tecido subcutâneo com preservação das demais estruturas (73x) Hematoxilina-eosina.

## 4.2 Regime Terapêutico

Observou-se que, quando o VAA passou a ser administrado quando a artrite já estava instalada, ou seja, do 17º ao 22º dia, houve a princípio redução dessa artrite por três dias com um pico máximo de efeito antiinflamatório do VAA no 20º dia onde a artrite foi inibida em cerca de 58%. A partir do 4º dia de administração do VAA, porém, houve perda do seu efeito antiinflamatório, seguindo a artrite o seu curso natural. Comparativamente, a dexametasona manteve a mesma intensidade de redução da artrite, porém seu efeito se mostrou mais duradouro. (figura 19-A).

Calculando-se, as áreas sôbre as curvas edema de pata x tempo do 17º ao 22º dia de artrite, observou-se redução estatisticamente significativa das áreas dos grupos tratados, durante o período de administração do VAA e dexametasona em relação ao grupo controle. O efeito da dexametasona foi, em média, mais intenso (figura 19-B).

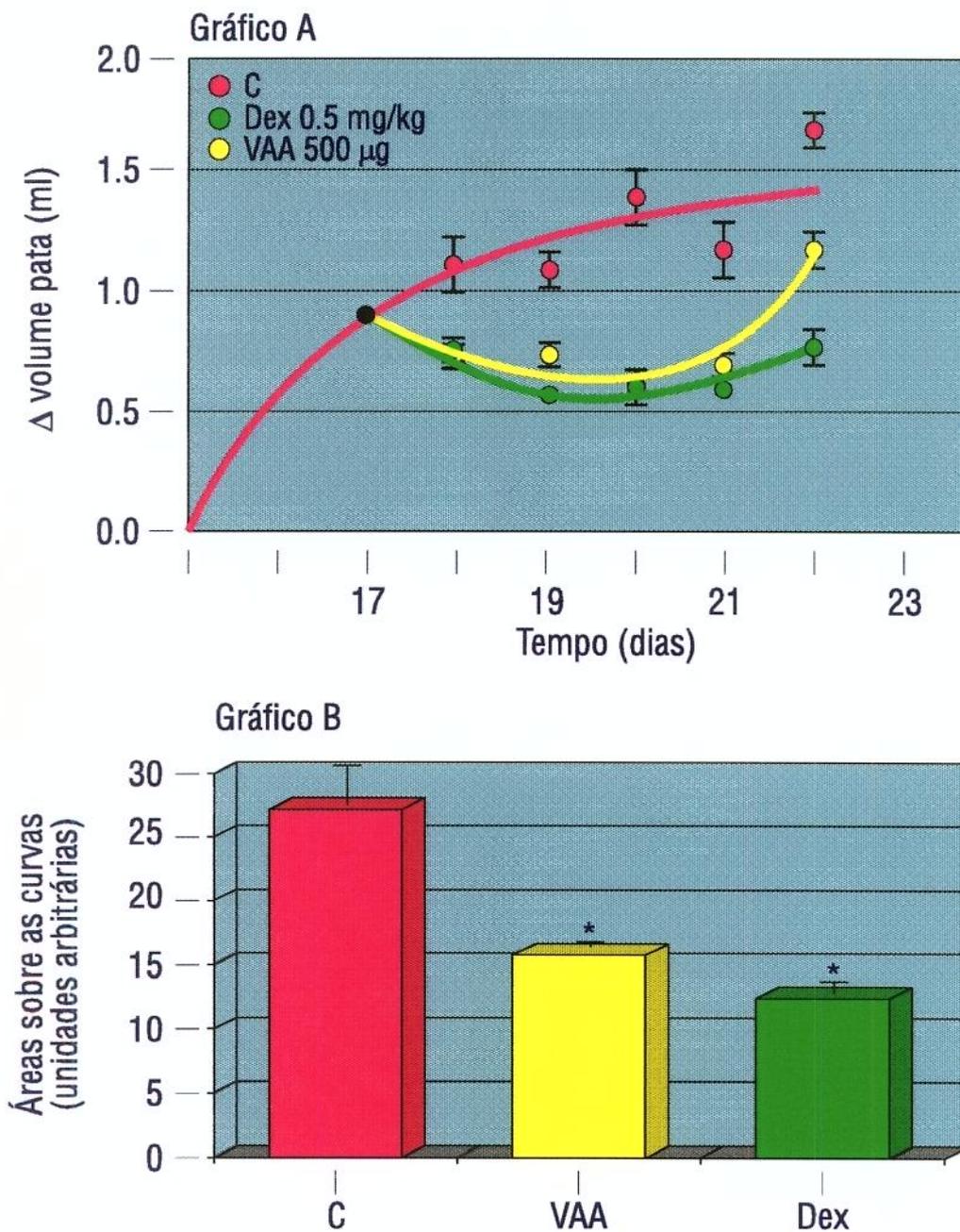


Figura 19 - **Efeito supressivo do veneno de abelha africanizada (VAA) e dexametasona (DEX) sobre a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos.** Em (A) curso temporal e em (B) área sobre a curvas edema x tempo, em unidades arbitrárias. Os tratamentos (doses diárias, *s.c.*) se iniciaram no 17º dia, após a injeção do adjuvante, e se estenderam até o 22º dia. Resultados como média ± EPM. O número de animais utilizados foi de 6 por grupo. \* $p < 0,05$  (ANOVA; teste de DUNCAN).

## **IV Discussão**

A artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos é tida como o modelo experimental de artrite que mais se assemelha à artrite reumatóide humana (TAUROG *et alii*, 1988).

Ao VAA tem sido atribuído, por alguns pesquisadores, atividade antiinflamatória sobre as artrites. Porém, existe ainda a necessidade de se continuar a investigar melhor essa atividade e seu potencial mecanismo de ação.

A proposição inicial desse trabalho foi a de que o VAA poderia agir como antiinflamatório, não somente sobre aquele tipo de artrite experimental, modelo de hipersensibilidade tardia e, portanto, de inflamação crônica, como em situações de inflamação aguda.

LORENZETTI *et alii* (1972) estudaram a influência do VA sobre a artrite induzida por adjuvante de Freund, administrando-o nas doses de 1 e 4 mg/Kg, s.c., na região escapular de ratos, em regimes profilático e terapêutico. O primeiro, caracterizou-se pela administração do VA quinze dias antes do adjuvante, em 3 doses semanais, e, o segundo, pela injeção do VA uma semana após o adjuvante, em 3 doses semanais, por 4 semanas. A fenilbutazona foi utilizada como controle positivo nesse trabalho. Esses pesquisadores concluíram que a administração do VA reduziu significativamente a artrite em ambos os regimes, com efeitos mais pronunciados na dose maior.

ZURIER *et alii* (1973) mostraram que o tratamento de ratos com VA integral injetado concomitante ao adjuvante de Freund, nas doses de 300 e 500µg, duas vezes ao dia, por vinte dias, suprimiu a artrite. Entretanto, o tratamento isolado com as frações do VA, quais sejam, a fosfolipase A2, a apamina e melitina, não reduziram a resposta inflamatória.

CHANG & BLIVEN (1979), alguns anos mais tarde, também confirmaram os achados de LORENZETTI, ZURIER, e seus colaboradores, administrando o VA (doses de 0,1; 0,033; 0,33 e 1 mg) em ratos, s.c., por 17 dias a partir da inoculação do adjuvante. Observaram que o VA suprimia o desenvolvimento da artrite numa relação dose-dependente, chegando a 70% de inibição na dose de 1 mg/rato. Por outro lado, utilizando-se dose única de 500µg, a efetividade foi dependente do tempo de administração. Quando injetado um dia antes ou concomitante ao adjuvante, observou-se cerca de 40% de inibição. Esse efeito foi, porém, decaindo progressivamente, à medida que a dose foi sendo retardada, chegando apenas a 10% quando injetada no décimo quarto dia após o adjuvante.

No presente trabalho avaliou-se a ação antiinflamatória do VAA na artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, inicialmente administrando-o 15 dias antes da injeção do adjuvante, em 3 doses semanais, num total de 6 doses. A análise no 17º dia após o adjuvante mostrou que o VAA foi capaz de suprimir a artrite em 45%, efeito comparável ao obtido pela administração de dexametasona. Essa inibição se manifestou, em primeiro lugar, pela visível melhora do quadro clínico apresentado pelo rato: sensível diminuição da poliartrite; dos nódulos subcutâneos na cauda e orelhas; maior motilidade dos ratos e menor perda de peso. A melhora clínica correlacionou-se com alterações anátomo-patológicas das articulações;

- 1 Diminuição acentuada da presença de infiltrado de células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) nos tecidos periarticulares, periosteal e na sinóvia;
- 2 Ausência de granulomas epitelióides e adiposos no tecido periarticular;

- 3 Praticamente ausência da formação do pannus e microabcessos;
- 4 Ausência de destruição cartilaginosa e regeneração óssea.

Os achados do estudo anátomo-patológico da artrite pré tratada com VAA foram extremamente semelhantes aos encontrados com o tratamento profilático com dexametasona.

Os resultados obtidos pelo método pletismográfico no tratamento profilático são concordantes com os de LORENZETTI *et alii* (1972). Entretanto, o efeito antiartrítico por nós observado (40 - 45% de redução) foi obtido com cerca de metade da dose utilizada por aqueles autores. Esses resultados sugerem que, comparativamente, a maior atividade possa ser devida à concentrações mais elevadas de componentes antiinflamatórios no VAA. Essa suposição deverá ser esclarecida por estudos bioquímico-farmacológicos das frações do VAA. BILLINGHAN *et alii* (1973), estudando o peptídeo MCD-401, uma das frações do VA referida como possuidora de importante atividade antiinflamatória, verificaram que o mesmo também era capaz de inibir a artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, profilática e terapêuticamente.

Deve ser enfatizado, porém, que mesmo na dose de 500µg/rato por nós utilizadas no pré-tratamento da artrite, observou-se áreas de necrose na região do dorso correspondente ao local das injeções. Isso constitui um fator limitante para o uso prolongado do VAA total.

Em relação à sua ação antiinflamatória, quando a artrite já estava clinicamente estabelecida, verificou-se que o VAA injetado a partir do 17º dia do adjuvante inibiu, temporariamente, a artrite. Entretanto, após o 5º dia de administração, o VAA perdeu a sua eficácia e a doença tomou o seu curso natural. Esses dados, diferem daqueles descritos por ZURIER *et alii* (1973). Por outro lado, são concordantes com os encontrados por CHANG & BLIVEN (1979). Esses autores, utilizando a partir do décimo sexto dia da injeção do adjuvante, injeções diárias de VA (500µg, s.c.) observaram uma supressão temporária da artrite por cerca de uma semana, a partir da qual ela tomou o seu curso natural. No entanto, o grupo que recebeu hidrocortisona, manteve a supressão até o trigésimo quinto dia.

A perda do efeito antiinflamatório do VAA sobre a artrite a partir do 22º dia poderia ser explicada pela necessidade de doses maiores do VAA durante esse período.

No entanto, não se pode negar, pelas evidências até agora obtidas, que o VA é capaz de suprimir o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund. O seu mecanismo de ação antiartrítica, porém, não tem sido claramente estabelecido.

A composição do VA é complexa. Entre as substâncias existentes estão enzimas como a fosfolipase A2 e hialuronidase, peptídeos de baixo peso molecular; histamina; íons inorgâ-

nicos e outras substâncias não identificadas (HABERMANN & REIZ, 1965). A maior parte da atividade biológica do VA é devida aos seus peptídeos e proteínas (CHANG & BLIVEN, 1979), sendo que três peptídeos básicos (melitina, apamina e o peptídeo MCD-401) foram isolados recentemente (HABERMANN & REIZ, 1965; HABERMANN & JENTSCH, 1966; VERNON *et alii*, 1969).

BILLINGHAN *et alii* (1973) demonstraram que desses três peptídeos, o peptídeo MCD-401 era o que apresentava maior atividade antiinflamatória sobre o edema de pata, em ratos, induzido pela carragenina, suprimindo, também, o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund.

Embora sejam observadas em cachorros e macacos elevações nos níveis séricos de cortisol após a administração do VA e ausência desses aumentos com a hipofisectomia (VICK *et alii*, 1971; VICK & SHIPMAN, 1972), HANSON *et alii* (1974) verificaram que a adrenalectomia reduzia, mas não abolia a ação antiinflamatória do peptídeo MCD-401, concluindo que as alterações na liberação de corticosterona deviam contribuir apenas parcialmente na ação antiinflamatória do VA.

LORENZETTI *et alii* (1972) e ZURIER *et alii* (1973), no entanto, verificaram que o VA não inibia a artrite induzida pelo adjuvante em animais adrenalectomizados, o que reforçaria a idéia de que a ação antiinflamatória do VA seria devida, essencialmente, ao estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

No modelo de inflamação aguda por nós utilizados verificamos que o VAA reduziu sua atividade antiinflamatória em pelo menos 80% sobre o edema de pata induzido pela carragenina, dextrana e pelo próprio VAA, em animais adrenalectomizados. Isso revela uma influência significativa da glândula adrenal na atividade antiinflamatória do VAA. A parcela inibida, porém, poderia ser atribuída a outros mecanismos de ação envolvidos, entre eles, degranulação de mastócitos, efeito de contra irritação, inibição de atividade de macrófagos, etc. (BILLINGHAN *et alii*, 1973; BANKS *et alii*, 1990; HADJTPETROU-KOUROUNAKIS & YIANGOU, 1988).

BILLINGHAN *et alii* (1973) relataram que o peptídeo MCD-401 foi cerca de cem vezes mais potente que a hidrocortisona em inibir o edema de pata induzido pela carragenina. O peptídeo, seria então, o responsável pelas alegadas propriedades curativas do VA. Entretanto, o VA contém somente pequenas quantidades desse peptídeo e quantidades elevadas de fosfolipase A2, melitina e apamina, todos eles altamente tóxicos e pouco aceitáveis como agentes terapêuticos.

HANSON *et alii* (1974) sugeriram que a ação antiinflamatória do peptídeo MCD-401 não deveria ser atribuída à liberação de aminas vasoativas; modificação na síntese de prostaglandinas ou pelas suas propriedades irritantes. Para esses autores o peptídeo exerceria a sua ação antiinflamatória por uma ação direta na parede vascular antagonizando a ação de agentes causadores de aumento de permeabilidade vascular.

A adrenalectomia pouco modifica a ação antiinflamatória do peptídeo MCD-401, podendo-se concluir que essa ação, presumivelmente, não seria mediada pela liberação de esteróides endógenos ou catecolaminas (BILLINGHAN *et alii*, 1973).

O peptídeo MCD-401, *in vivo*, é um degranulador de mastócitos (BREITHAUPT & HABERMAN, 1968; BILLINGHAN *et alii*, 1973; HANSON *et alii*, 1974), e como no rato isso envolve a liberação de histamina e 5HT, o peptídeo por si próprio possui atividade inflamatória. É possível, assim, que parte de sua atividade antiinflamatória seja consequência da liberação de histamina e 5HT (BANKS *et alii*, 1980) ou do fenômeno de contra irritação (BONTA, 1978; GARCIA LEME, 1981).

A contra irritação é uma circunstância complexa envolvendo fatores de origem plasmática e tissular e estados particulares do organismo, caracterizando-se pela habilidade de uma irritação interferir com uma outra em desenvolvimento simultâneo (GARCIA LEME, 1981).

GILLIES, em 1895, já referia que irritantes aplicados a alguma distância das articulações inflamadas podiam causar redução da exudação. A partir daí, inúmeras experiências têm demonstrado que a contra irritação é capaz de suprimir tanto o fenômeno agudo induzido por estímulos flogísticos como a carragenina, dextrana, caolin, bradicina, etc, como a proliferação de tecido de granulação e artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (BONTA, 1978).

BONTA (1978) sugeriu que uma série de mecanismos estariam provavelmente envolvidos na contra irritação:

1. Inibição da migração de leucócitos para a área injuriada;
2. Consumo de complemento;
- 3 A produção de um fator humoral antiinflamatório;
- 4 Exaustão competitiva de mediadores pró-inflamatórios;
- 5 Redução drástica da população de macrófagos.

Para BILLINGHAN *et alii* (1973) e HANSON *et alii* (1974) a atividade antiinflamatória do peptídeo MCD-401 é distinta e não depende da sua capacidade degranuladora de mastócitos. Esse fato aumenta o interesse sobre esse peptídeo como um futuro agente terapêutico nas artrites, embora seu efeito seja totalmente desconhecido no homem. Deve ser ressaltado que peptídeos/proteínas são geralmente, pouco atrativos como drogas terapêuticamente úteis, em função de seu alto custo para a síntese e obtenção e alto grau de destruição a nível intestinal (WINGARD *et alii*, 1991). Dessa forma, o racional mais interessante seria o desenvolvimento de drogas análogas ao peptídeo MCD-401 com parâmetros farmacocinéticos mais favoráveis para a utilização e terapêutica.

A administração prévia do MCD-401 inibiu o extravasamento de albumina marcada, provocada pela injeção de bradicinina, prostaglandina E2, calicreína, histamina, 5HT e do composto 48/80. Esse peptídeo mostrou-se efetivo, também, sobre o extravasamento provocado pelas injeções intraarticular de turpentina ou carragenina subplantar. Entretanto, o pré-tratamento com metisergida (antagonista de 5HT) e mepiramina (antagonista H1 da histamina) não alterou a atividade antiinflamatória do peptídeo (BILLINGHAN *et alii*, 1973).

Por outro lado, BANKS *et alii* (1990) verificaram que o peptídeo MCD-401 perdia sua atividade antiinflamatória em animais depletados de mastócitos, pelo pré-tratamento com o composto 48/80. A administração de mepiramina e metisergida também reduziu (50%) a atividade antiinflamatória desse peptídeo sobre o edema de pata induzido pela carragenina. Esses autores sugeriram então que os efeitos antiinflamatórios do peptídeo eram, em parte, mediados pela degranulação de mastócitos.

Dessa forma, pelos dados até agora demonstrados o peptídeo MCD-401 possui atividade irritante, visto que, em ratos:

1. a injeção direta do peptídeo em uma das patas traseiras causa edema tanto na pata injetada como na não injetada;
2. a injeção, s.c., do peptídeo 45 minutos antes da injeção subplantar do mesmo, suprime significativamente, sua ação irritante na pata;
3. a co-administração do peptídeo com a carragenina produz um aumento dose-dependente, da resposta inflamatória (BANKS *et alii*, 1990). O fato de quando injetado junto com a carragenina, o peptídeo 401 ter causado um considerável aumento do edema foi sugestivo de que o mesmo atue como um agente contra irritante.

Diante disso, BANKS *et alii* (1990) sugeriram que seja pouco provável que o peptídeo MCD-401 tenha algum valor terapêutico, muito embora seja ativo tanto nas fases iniciais e finais do edema induzido pela carragenina.

No entanto, CHANG & BLIVEN (1970) discordam desta proposição, porque:

- 1 Nas doses utilizadas, a ação irritante do VA foi de curta duração, não se observando nenhum outro sinal de inflamação no local da injeção, a não ser um eritema durante a primeira hora após a injeção;
- 2 Uma única dose do VA, administrada 10 ou 11 dias antes da artrite se desenvolver, foi altamente efetiva em suprimir a doença;
- 3 O tratamento com VA, administrado em dose única, durante o desenvolvimento da artrite, estágio da doença na qual esses autores referiram ser mais susceptível ao efeito de contra irritação, foi muito menos efetivo.

Uma outra possibilidade aventada por CHANG & BLIVEN (1979) foi a de que o VA atue como imunossupressor. As drogas imunossupressoras, diferentemente dos agentes antiinflamatórios, são mais efetivas experimentalmente, quando administradas precocemente, durante o período de sensibilização, isto é, nos primeiros quatro dias que se seguem à injeção do adjuvante de Freund. No entanto, são menos efetivas quando a doença já está instalada, como parece ser o caso do VA.

Desde que o VA contém material imunogênico, ele poderia atuar na artrite experimental ativando mecanismos de imunossupressão, por competição com antígeno. A favor disso, está a constatação de que ocorreu supressão significativa do desenvolvimento da artrite quando o VA foi incorporado ao adjuvante de Freund.

CHANG & BLIVEN também sugeriram a possibilidade do VA atuar como agente imunossupressor, de forma semelhante à ciclofosfamida visto que, uma única dose desta droga, administrada junto com o adjuvante causou 70% de inibição da artrite. Mais ainda, semelhantemente ao que se observou com o VA, à medida que essa injeção era retardada, a efetividade tornava-se progressivamente menor.

Apoiando-se na idéia de que um mecanismo de imunossupressão estaria envolvido na ação do VA sobre a artrite por adjuvante, HADJIPETROU-KOUROUNAKIS & YIANGOU (1988) mostraram que o tratamento com VA reduz significativamente o número de folículos linfóides no baço de animais imunizados com hemáceas de carneiro, assim como de linfócitos T, sugerindo que o VA alteraria direta ou indiretamente, as populações de linfócitos. Esses autores observaram, *in vitro*, sensível diminuição na produção de algumas

linfocinas, concluindo que o tratamento com VA afeta a produção de Il-1 diretamente pelos macrófagos. Dessa forma, sugeriram que o tratamento com VA interferia no desenvolvimento da artrite por adjuvante por inibir certas funções dos macrófagos e, indiretamente, a ativação de linfócitos T e B.

Se a artrite por adjuvante é o resultado de um processo auto-imune, o VA, ao inibir, no período de sensibilização, determinadas funções dos macrófagos, diminuindo a produção de linfocinas e inibindo a ativação de linfócitos T e B, estaria interferindo, substancialmente, no desenvolvimento dessa artrite.

Sabe-se que, na AR, o principal mecanismo que leva a destruição articular é a liberação local de citocinas pelos monócitos e linfócitos, que estimulam os condrócitos e osteoclastos a quebrar, respectivamente, a cartilagem e o osso (PELLETIER *et alii*, 1993).

Os osteoclastos são ativados direta ou indiretamente pelas linfocinas produzidos pelos linfócitos T.

O antígeno presente nas células macrofágicas estimula os linfócitos T a liberar MAF e citocinas. Esses linfócitos e outras células estimulam os macrófagos a sintetizar Il1, TNF e Il6. A Il1 e o TNF podem induzir a produção de colagenases e outras proteases nos fibroblastos sinoviais e nos condrócitos localizados na cartilagem articular adjacente. Essas enzimas degradam proteoglicano e colágeno resultando na destruição cartilaginosa.

Os resultados do estudo anátomo-patológico da articulação acometida pela artrite por adjuvante e pré tratada com VAA nos revelam sensível diminuição do número de granulomas epitelióides, praticamente ausência da formação do pannus, e de destruição cartilaginosa. Isso nos sugere, como afirmam HADJIPETROU-KOUROUNAKIS & YIANGOU (1988) que o VA possa exercer uma ação supressora sobre linfócitos T e macrófagos, com conseqüente inibição na produção de citocinas, justificando assim a não estimulação dos condrócitos e osteoclastos e, conseqüente, ausência de destruição cartilaginosa e óssea observada microscopicamente.

A diminuição da produção de Il1 encontrada por esses autores em ratos tratados com VAA poderia explicar também os achados de sensível diminuição na formação do pannus e da destruição tecidual por nós encontrados, assim como provável diminuição da quimiotaxia de células polimorfonucleares (microabscessos), linfócitos e monócitos, inibição da proliferação fibroblástica, da produção de PGE2 e de enzimas como colagenases e proteases pelos fibroblastos, efeitos esses importantes na fisiopatogenia da artrite e induzidos por essa citocina (PELLETIER, 1993).

Quanto ao mecanismo de ação do VAA, comparativamente às drogas utilizadas hoje no tratamento das artrites, particularmente, na AR várias hipóteses poderiam ser aventadas. O VAA atuaria com um mecanismo de ação semelhante aos AINE, aos glicocorticóides ou ainda às drogas imunossupressoras? (Esquema)

Sugestivamente são colocados no esquema a seguir vários pontos onde potencialmente o VAA atuaria como antiinflamatório.

Sabidamente os AINE atuam como inibidores potentes da produção de prostaglandinas, através da inibição da ciclooxigenase, interferindo, conseqüentemente, em várias fases da patogenese da AR. Sabe-se que a PGE não interfere porém, apenas nos sintomas da AR-dor e inflamação, mas a sua produção parece ser um componente necessário da liberação de colagenase pelos monócitos estimulados e, também, um requisito para a produção do fator de ativação dos osteoclastos (GOODWIN, 1985).

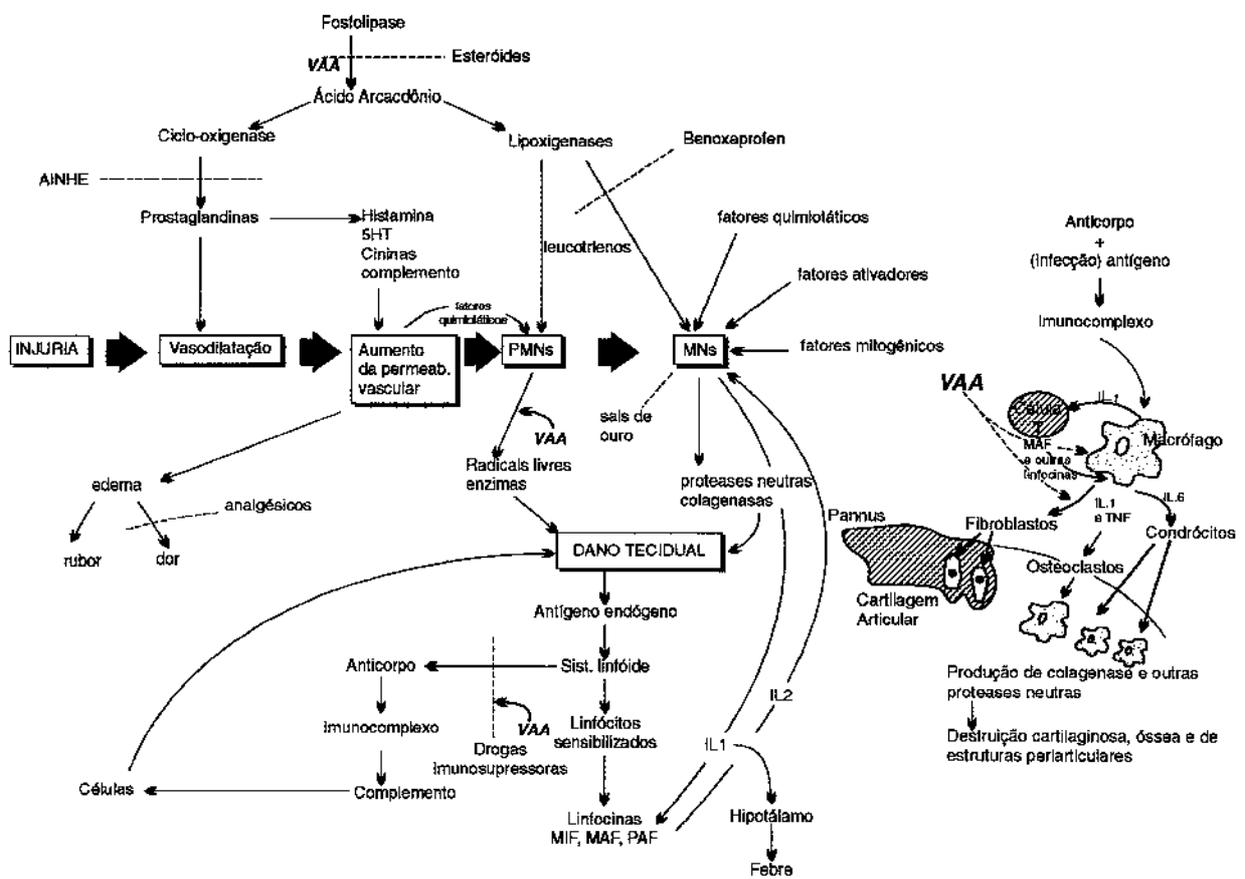
A estimulação da produção de leucotrienos é outro mecanismo pelo qual os AINE podem exercer efeitos imunomoduladores. Verificou-se em vários sistemas *in vitro* (GOODWIN, 1985) que os AINE, inibindo a ciclooxigenase, desviam os precursores do ácido aracônico para a via de 5-lipooxigenase, resultando em aumento da produção de leucotrienos. Foi também demonstrado que alguns produtos da lipooxigenase, particularmente o leucotrieno B<sub>4</sub> são estímulos potentes da geração de células supressoras. Assim, os AINE podem estimular as células supressoras, *in vivo*, não só pela remoção da PGE, mas aumentando também o leucotrieno B<sub>4</sub> proveniente dos linfócitos que infiltram a sinóvia reumatóide. Os AINE parecem também funcionar, em parte, inibindo a liberação de colagenase pelos monócitos, impedindo a migração e ativação de neutrófilos e inibindo a ligação do cálcio na membrana celular destas células (NORTHOUER *et alii*, 1985).

É possível que estejam envolvidos todos esses mecanismos na ação antiinflamatória do VAA.

Constatamos nesse trabalho uma similaridade importante no efeito antiinflamatório do VAA com o dexametasona.

Em termos gerais, os efeitos imunológicos dos glicocorticóides podem ser divididos em 3 categorias principais: (1) efeitos sobre a cinética circulatória dos leucócitos, (2) efeitos sobre a função dos leucócitos, (3) efeitos sobre o leito vascular (MEULEMAN & KATZ, 1985).

Em relação ao primeiro item o que se observa é uma redução nos números absolutos e relativos dos linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos e um aumento no número de neutrófilos.



Esquema - Prováveis locais de ação do VAA na fisiopatogenia da artrite

A linfocitopenia produzida pelos glicocorticóides resulta principalmente de uma redistribuição de parte do pool de linfócitos circulantes para o interior dos tecidos linfóides. Os linfócitos que recirculam são predominantemente células T e a linfocitopenia induzida pelos glicocorticóides é devida em grande parte à migração das células T circulantes para os tecidos linfóides. Essa ação não constatamos no VAA, visto que após 15 dias de tratamento os ratos não apresentaram leucocitose, ou leucopenia ou linfocitopenia.

Em relação aos efeitos sobre a função dos leucócitos pode-se dizer que os neutrófilos são relativamente resistentes à ação dos glicocorticóides e que o efeito por eles provocado sobre a atividade quimiotáxica é pequeno. No entanto, a síntese/liberação de citocinas por macrófagos é inibida pelos corticóides (RIBEIRO *et alii*, 1991). A liberação de enzimas lisossômicas é pouco afetada e eles não inibem a liberação de várias enzimas não-lisossômicas (colagenase, elastase e fator ativador do plasminogenio) ( MEULEMAN & KATZ, 1985).

Há evidências de que as concentrações muito elevadas de glicocorticóides podem inibir a produção de superóxido de hidrogênio e de peróxido pelos neutrófilos.

Contrastando com os neutrófilos, na população de linfócitos ocorrem múltiplas alterações funcionais, por ação destas drogas.

A proliferação das células T é mediada pelo menos em parte pela IL-2 ou fator de crescimento de células T. A produção desse fator está diminuída pelos glicocorticóides.

Em relação aos monócitos, o que se observa é que a atividade bactericida monocítica está diminuída pelos glicocorticóides, ocorrendo um recrutamento diminuído de macrófagos para a área agredida.

Nos últimos anos tornou-se evidente que o processo inflamatório é mediado, em grande parte, pelas prostaglandinas e pelo leucotrienos. A primeira fase do processo é a liberação de fosfolípido do ácido aracdônico da membrana celular, pela fosfolipase A<sub>2</sub>. Os glicocorticóides estimulam a produção de uma proteína nova (lipomodulina) que inibe a fosfolipase A<sub>2</sub> e, assim, bloqueia a produção de prostaglandinas e leucotrienos. Recentemente, também foi demonstrado que os glicocorticóides em doses farmacológicas, inibem a liberação de histamina pelos mastócitos.

Sobre o leito vascular o seu efeito mais importante é a diminuição da migração de leucócitos para o foco inflamatório.

Em resumo, os glicocorticóides tem uma variedade ampla de efeitos sobre os mecanismos de defesa. Estes predominam sobre o componente celular, em vez do componente humoral da resposta imune. O efeito antiinflamatório mais significativo dos glicocorticóides, prova-

velmente, seja a supressão do acúmulo de leucócitos na área inflamada e esse efeito parece ser o responsável pelo benefício obtido nas doenças inflamatórias e auto-imunes.

O VA atua de forma semelhante aos glicocorticóides?

Devido ao aumento da atividade imunológica em muitas das chamadas doenças auto-imunes as drogas imunossupressoras tem obtido cada vez mais espaço na terapêutica dessas patologias, como na AR. Entre elas, está o metotrexate.

O metotrexate é um análogo do ácido fólico que atua inibindo a diidrofolato redutase, a enzima necessária para converter o ácido fólico nos cofatores reduzidos do folato. Esta inibição resulta na depleção de folatos necessários para a síntese de timidilato e purina; assim a formação de DNA é bloqueada.

KOUROUNAKIS & KAPUSTA (1976) utilizando metotrexate na artrite por adjuvante verificaram que essa droga inibiu a atividade da doença. O VAA teria ação similar a essa droga?

O metotrexate suprime as respostas imunológicas humoral e celular. Em concentrações baixas aumenta as células “Natural Killers” humanas que são importantes no processo de vigilância imunológica.

À parte da sua capacidade imunossupressora, o metotrexate parece também ter propriedades antiinflamatórias. Ele é um “imunomodulador”, modulando a função das células da inflamação e as células envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos. O metotrexate diminui a produção de LTB<sub>4</sub>, bem como a proliferação de linfócitos, a formação de anticorpos e as reações de hipersensibilidade tardia sem afetar o número de monócitos circulantes (BRUCE, 1992). Além disso, o metotrexate promove a liberação de adenosina, um potente autocoide antiinflamatório, no local inflamado e inibe a formação de S-adenosil-metionine, diminuindo as reações de metilação que acontecem nas células inflamatórias para acumular e liberar seus produtos tóxicos no local da inflamação. (BRUCE, 1992).

Diante de todo esse arsenal terapêutico de que se dispõe hoje para as artrites humanas, em várias situações constata-se que os resultados nem sempre são satisfatórios. Assim, a busca de alternativas mais eficazes para o seu tratamento é sempre desejável.

O presente trabalho demonstra que o VAA é, experimentalmente, um potente agente antiinflamatório. Contudo, são necessários maiores esforços para elucidarmos com clareza o seu mecanismo de ação e nos dispormos a utilizá-lo na prática médica.

## V Resumo

No presente trabalho o efeito antiinflamatório do VAA foi estudado em modelos de inflamação aguda (edema de pata induzido por Carragenina, Dextrana e VAA) e crônica (artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund) em ratos Wistar. Observou-se que:

- 1 O VAA (20,100 e 500  $\mu\text{g}$ , s.c.) inibiu o edema de pata induzido pela carragenina, dextrana e pelo próprio VAA, efeito esse foi dose-dependente;
- 2 A adrenalectomia suprimiu a inibição do VAA sobre o edema de pata induzido pela carragenina, dextrana e VAA, em pelo menos 80%;
- 3 O VAA causou efeito antiinflamatório sobre a artrite induzida por adjuvante completo de Freund quando administrado profilática e terapêuticamente;

- 4 A redução da artrite (45%) com o pré-tratamento com VAA (500µg, s.c., 15 dias antes da injeção do adjuvante, 3 doses semanais) foi similar a encontrada com utilização da dexametasona;
- 5 O estudo anatomo-patológico das articulações com artrite pré-tratada com VAA mostrou acentuada diminuição do infiltrado mononuclear em tecido subcutâneo e periarticular, e praticamente, ausência da formação de granulomas epitelióides, microabcessos, pannus e regeneração óssea;
- 6 O tratamento da artrite induzida por adjuvante com VAA (500µg, s.c., diariamente por uma semana, a partir do 17º dia após o adjuvante) reduziu a artrite em cerca de 58% após 3 dias de administração perdendo, porém, a sua eficácia a partir do 4º dia, quando a artrite seguiu o seu curso natural.

A análise desses dados nos leva a concluir que o VAA apresenta importante efeito antiinflamatório, dependente em grande parte da glândula adrenal, sendo capaz de alterar o curso do desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund, modificando de maneira significativa as alterações histopatológicas dessa patologia.

## VI Summary

In the present work, the anti-inflammatory action of venom from Africanized bees was studied in a model of acute inflammation (rat paw edema induced by carrageenin, dextran and bee venom itself) and chronic inflammation (arthritis induced by Freund's complete adjuvant) in Wistar rats. The main conclusions were:

1. Bee venom (20, 00, and 500  $\mu\text{g}$ , *s.c.*) dose-dependently inhibited the paw edema induced by carrageenin, dextran and the venom itself;
2. Adrenalectomy abolished by more than 80% the venom-induced inhibition of the edema caused by the above agents;
3. Bee venom had an anti-inflammatory action on the arthritis induced by Freund's complete adjuvant when administered either before or after the latter;

4. The reduction in arthritis (45%) observed following pre-treatment of the animals with bee venom (500 µg, *s.c.*, 3 doses per week for 15 days before the injection of adjuvant), was similar to that observed with dexamethasone;
5. Examination of the arthritic articulations pre-treated with bee venom revealed that there was a marked decrease in the mononuclear cell infiltrate into the subcutaneous and periarticular tissue with an almost total absence of epithelioid granulomas, microabscesses and bone regeneration;
6. Treatment of the adjuvant-induced arthritis with bee venom (500 µg, *s.c.*, daily for one week starting on the seventeenth day after adjuvant administration) resulted in a decrease of approximately 58% in the arthritis after three days but was ineffective from the fourth day onwards when the arthritis resumed its normal course.

The above results suggest that bee venom has important anti-inflammatory activity which is mediated by the adrenal gland. The venom is able to hinder the progress of arthritis induced by Freund's complete adjuvant and can produce important histopathological alterations.

## VII Referências Bibliográficas

- ARTEMOV, N. M. - Les bases biologiques de l'usage thérapeutique der venin d'abeille. *Ministère de L'Agriculture*, Rússia, 1964.
- BANKS, B. E. C.; DEMPSEY, C. E.; VERNON, C. A.; YAMEY, J. - The mast cell degranulating peptide from bee venom. *J. Physiol.* **308**: 95-96, 1980.
- BANKS, B. E. C.; DEMPSEY, C. E.; VERNON, C. A.; WARMER, J. A.; YAMEY, J. Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulating in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **99**: 350-354, 1990.
- BECK, B. F. - Bee Venon Therapy; Bee Venon its Nature and its Effect on Arthritic and Rheumatoid Conditions. *Appleton-Century Crofts*, New York, 1935.
- BILLINGHAN, M. E. J.; MORLEY, J.; HANSON, J. M.; SHIPOLINI, R. A. & VERNON, C. A. - Anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature*, **245**: 163-164, 1973.
- BONTA, I. L. - Endogenous Modulators of the inflammatory response. In *Inflammation* (Edited by VANE J. R. & FERREIRA S. H.), 523-567, Springer, Berlin, 1978.

- BREITHAUPT, H. & HABERMANN, E. - *Arch. expl. Path. Pharmacol.*, **261**: 252, 1968.
- BRUCE, N. C. - Molecular Mechanism of methotrexate action in inflammation. *Inflammation*, **16**: 411-423, 1992.
- CHANG, Y. H.; PEARSON, C. M. & ABE, C. - Adjuvant Polyarthritis - Reduction by a Synthetic Adjuvant: Immunologic, Histopathologic, and Other Studies. *Arthritis and Rheumatism*, **23**: 62-71, 1980.
- CHANG, Y. H. & BLIVEN, M. L. - Anti-Arthritic Effect of Bee Venon. *Agents and Action*, **9**: 205-211, 1979.
- COUCH, T. L.; BENTON, A. W. - The Effect of the venon of the Honey Bee *Apis Mellifera* L., on the Adrenocortical Response of the Adult Male Rat. *Toxicol.*, **10**: 55-62, 1972.
- DEMPSEY, C. E.; BANKS, B. E. C.; ROBERTS, N. A. & VERNON, C. A. - Inhibition of prostaglandin biosynthesis by the mast-cell-degranulation agent compound 48/80 but not by the mast-cell-degranulating peptide (peptide - 401) from bee venon. *Biochemical Pharmacology*, **34**: 2391-2394, 1985.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P. & WILLOUGHY, D. A. - Studies of the Mediators of the Acute Inflammatory Response Induced in rats in different sites by carrageenan and Turpentine. *J. Path. Cact.*, **104**: 15-29, 1970.
- DUNCAN, D. B. - Multiple range and multiple F. tests. *Biometrics*, **11**: 1-42, 1955.
- FERREIRA, D. B. - Envenenamento experimental em ratos com peçonha de abelhas africanizadas: anatomia patológica, enzimas séricas (AST e CK) e catecolaminas cardíacas. Tese de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 1990.
- FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. - Prostaglandinas and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br. J. Pharmacol.* **48**: 86, 1974.
- FLOWERS, R. J. - Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A2. Rn: Anti-inflammatory steroid action. Basic and clinical aspects (Ed R. P. Schleimer, H. N. Clamor and A. L. Orons-Ky), chapter 3, pp. 48-66. Academic Press, Inc., New York, 1989.
- FRANKLAND, A. W. & LESSOF, M. H. - Allergy to bee stings: a review. *J. Royal Soc. Med.* **73**: 807-810, 1980.
- GARCIA, L. *Gen. Pharmac.* **12**: 15-24, 1981.
- GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; RUMJANEK, F. D.; SHIPOLINI, R. A. & VERNON, C. A. - The structures of some peptides from bee venom. *EUR. J. Biochem.*, **61**: 369-376, 1976.
- GILLIES, C. H. - The Theory and Practice of counter-irritation. (Macmillan and Co., London), 1895.
- GOODWIN, J. S. - Efeitos imunológicos dos Agentes antiinflamatórios não esteróides. *Clin. Med. da Am. do Norte*, **4**: 835-843, 1985.

- HABERMANN, E. & REIZ, K. G. - *Biochem. 2., 314*: 192-203, 1965.
- HABERMANN, E. & JENTSCH, - *J. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 253*: 40-41, 1966.
- HABERMANN, E. - Le venim IV Chimie, pharmacologie, et toxicologie der venium. *Traite de Biologie Abeille, 3*: 363, 1968.
- HABERMANN, E. - Bee and wasp venoms. *Science, 177*: 314-322, 1972.
- HADJIPETROU-KOUROUNAKIS, L. & YIANGOU, M. - Bee venom and adjuvant induced disease (letter). *J. Rheumatol. 11*: 720, 1984.
- HADJIPETROU-KOUROUNAKIS, L. & YIANGOU, M. - Bee venom, adjuvant induced disease and interleukin production. *J. Rheumatol. 15*: 1126-1128, 1988.
- HANSON, J. M.; MORLEY, J. & HERRERA, S. - Anti-inflammatory property of 401 (MCD-peptide), a peptide from the venom of the Bee *Apis Mellifera*. (L.). *Br. J. Pharmac. Chemother, 50*: 383, 1974.
- HOLLANDER, J. L. - Bee venom in the treatment of chronic arthritis. *Am. J. Med. Sci, 201*: 976-801, 1941.
- KALLIOMAKI, J. L.; SAARIMAA, H. A., & TOINAVEN - Inhibition by 6 - Mercaptopurinl of Polyarthritis induced by Freund's Adjuvant. *Ann. rheum. Dis., 23*: 78-80, 1964.
- KRAMER, C. Y. - Extension of multiple range tests to group means with unegual numbers of replications. *Biometrics, 12 (3)*: 307-310, 1956.
- KOUROUNAKIS, L & KAPUSTA, M. A. - Restauration of diminished T-cell function in adjuvant induced disease by methotrexate: Evidence for two populations of splenic T-cell suppressors. *J. Rheumatol., 3*: 346-354, 1976.
- LOCKSHIN, M. D. - The unproven Remedies Commitee. *Arthritis and Rheumatism, 24*: 1188-1189, 1981.
- LORENZETTI, O. J.; FORTEM BERRY, B. & BUSBY, E. - Influence of bee venom in the adjuvant-induced arthritic. *Research Communications in Chem. Pathol. and Pharmac., 4*: 339-351, 1972.
- MABERLY, F. H. - Brief Notes on the treatment of Rheumatism by bee stings. *Lancet, 7*: 235, 1910.
- MELLO, M. L. S. - O veneno das abelhas. In: CAMARGO, J., M., F. *Manual de Apicultura*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres., 143-5, 1972.
- MEULEMANN, J. & KATZ, P. - Efeitos imunológicos, cinética e uso dos glicorticoides. *Cl. Med. da Am. do Norte, 4*: 849-861, 1985.
- NEUMANN, W. & STRACK, A. - Untersuchen mit Biehengift und Histamin an der Fornaldehyde-arthritis der Ralte. *Arch. exp. Path. Pharmak, 213*: 8, 1951.

- NORTHOUER, A.; M. & NORTHOUER, B. J. - Calcium ions in acute inflammation: a possible site for anti-inflammatory dry action. *The pharmacology of inflammation*, 5: 235-254, 1985.
- O' CONNOR, R.; ROSEMBROOK, Jr., W. M. & ERICKSON, R. - Hymenoptera: pure venom from bees, wasp, hornets. *Science*, 139: 420, 1963.
- OTTHERNESS, I. G. & MOORE, P. F. - Carrageenan foot edema test. *In Enzymology, Part L "Chemotaxis and Inflammation"* (Ed. Giovanni Disabato), 28: 320-327, 1988.
- PANUSH, R. S. - Honeybees and arthritis: Sharpening perspective on a sticky issue. *The journal of Rheumatology*, 15: 10, 1988.
- PEARSON, C. M. - Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91: 95-101, 1956.
- PELLETIER, J. P.; DIBATTISTA, J. A.; ROUGHLEY, P.; Mc COLLUM, R. & MARTEL-PELLETIER, J. - Cytokines and Inflammation in Cartilage Degradation, *In: Osteoarthritis, Rheumatic Disease Clinics of North America series* (Ed. ROLLAND W. MOSKOWITZ), 19 (3): 545-568, 1993.
- RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. O. & FERREIRA, S. H. - IL-8 causes in vivo neutrophil migration by cell-dependent mechanism. *Immunology*, 73: 472-477,, 1991.
- ROCHA E SILVA. - Histamine and antihistaminics. Pt. I. In: *Handbook of Experimental Pharmacology. vol. XVIII/1* (EICHLER, O. and FARAH, A., Eds.). New York: Springer, 1966.
- ROTHSCHILD, A. M. - Mechanism of histamine release by animal venom. *Mern. Inst. Butantan*, 33 (2): 467-476, 1965.
- RUSSEL, F. E. - Comparative pharmacology of some animal toxins. *Federation Proc.*, 2: 1206-1224, 1967.
- SCHLEIMER, R. P.; CLAMAN, H. N. and ORONSKY, A. L. (eds) - Anti-inflammatory steroid action: basic and clinical aspects. Academic Press, INC. San Diego, California, 1989.
- SELYE, H.; - Perspectives in stress research. *Perspect. Biol. Med.*, 2: 403, 1959.
- SHKENDEROV, V. & KOBUROVA, K. - Adolapin-Anewly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. *Toxicon*, 20: 317-321, 1982.
- SNEDECOR, G. M.; - Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. The Iowa University Press, Iowa, 1963.
- SOMMERFIELD, S. D.; - Bee venom and arthritis (letter) *J. Rheumatol.* 13: 477, 1986.
- TANNENBAUM, H. & GREENSPOON, M. - Bee venom therapy of adjuvant arthritis (letter). *J. Rheumatol.* 9: 649, 1982.

- TAUROG, J. D., ARGENTIERI, D. & McREYNOLDS, R. A. - Adjuvant Arthritis. *In Enzymology, Part L "Chemotaxis and Inflammation"* (Ed. Giovanni Disabato), **162**: 339-347, 1988.
- TUNNER, C. D. *General Endocrinology* Philadelphia: W. B. Sanders, 1966.
- VERNON, C. A., HANSON, J. M & BRIMBLECOMBE, R. W. - British Patent. n 131 4823, 1969.
- VICK, J. A. - Pharmacological studies of bee venom in unanesthetized monkeys. *Pharmacologist*, **13**: 240, 1971.
- VICK, J. A. & SHIPMAN, W. H. - Effects of whole bee venom and its fractions (apamina and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon*, **10**: 377, 1972.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F. & SELPH, J. L. - Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fedn. Proc.*, **35**: 2447-2456, 1976.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. & VOELKER, F. A. - Pathway of onset, development and decay of carrageenin pleurisy in the rat. *Fedn. Proc.*, **41**: 2588-2595, 1982.
- WALZ, D. T.; DIMARTINO, M. J. & MISHNER, A. - Adjuvant-induced arthritis in rats II. Drug Effects on Physiologic, Biochemical and Immunologic Parameters. *J. Pharmac. exp. Ther.*, **178**: 223-231, 1971.
- WEIDMANN, H. & MOLLER, E. - Die Wirkung von Bienengiften auf das Hypophysen - Nebennieren - System der Ratte. *Arch. exp. Path. Pharmac.*, **220**: 465, 1953.
- WELLES, W. L.; SILKWORTH, J.; ORONSKY, A. L.; KERWAR, S. S. & GALIVAN, J. Studies on the effect of low dose methotrexate on rat adjuvant arthritis. *J. Rheumatol*; **12**: 904-906, 1985.
- WILIANS & WILKENS Co. - Hippocrates: The theory and practice of medicine. Philosophical Library, New York, 373, 1964.
- WINGARD JR. L. B.; BRODO, T. M.; LARNER, J. & SCHWARTZ, A. - *Human Pharmacology from molecular to clinical* **12**: 165. Mosby year Book Ed. St. Louis, U.S.A., 1991.
- WINTER, C. A.; RISLEY, G. A. & NUSS, G. W. - Carrageenan-induced edema in hind-paw of the rat as an assay for Anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **111**: 544-547, 1962.
- WINTER, C. A. & NUSS, G. W. - Treatment of adjuvant arthritis in rats with anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheuma*. **9**: 394-404, 1966.
- WINTER, C. A. - Non-steroid anti-inflammatory agents. *Fortschr. Arzneimitt. Forsch.*, **10**: 139, 1966.
- ZURIER, R. B.; MITNICK, H.; BLOONGARDEN, D. & WEISSMANN, G. - Effect of bee venom on experimental arthritis. *Am. Rheum. Dis.*, **32**: 466-469, 1973.

## Lista de abreviaturas utilizadas

AINE	Antiinflamatório não esteroidais
AR	Artrite reumatóide
Cg	Carragenina
Cm	Centímetro
DC	Destruição cartilaginosa
Dexam.	Dexametasona
Dxt	Dextrana
G	Grama
GA	Granuloma adiposo
GE	Granuloma epitelióide
HE	Hematoxilina-eosina
IL1	Interleucina 1
IL2	Interleucina 2
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno 4
Lot	Lote
Kg	Quilograma
MA	Microabcesso
MAF	Fator de ativação de macrófagos
Mg	Miligrama
MI	Mililitro
Mod	Modelo
P	Pannus
PM	Peso molecular
PA	Periarticular
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PO	Periosteal
RO	Regeneração óssea
S	Sinóvia
TNF	Fator de necrose tumoral
µg	Micrograma
VA	Veneno de abelha
VAA	Veneno de abelha africanizada