



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Biotecnologia em Saúde

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE ABELHA *Apis  
mellifera*

Paulo César Pereira de Sousa

Fortaleza – CE  
2012



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

Paulo César Pereira de Sousa

Fortaleza – CE  
2012

Paulo César Pereira de Sousa

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA  
2012

S698e Sousa, Paulo César Pereira de

Estudo das alterações renais e vasculares induzidas pelo veneno total e frações isoladas *de Apis mellifera* / Paulo César Pereira de Sousa. – 2012.

148 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Toxicologia. 2. Rim. 3. Vasos Sanguíneos. I. Título.

Paulo César Pereira de Sousa

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

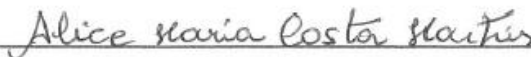
Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Aprovada em: 25/07/2012


BANCA EXAMINADORA



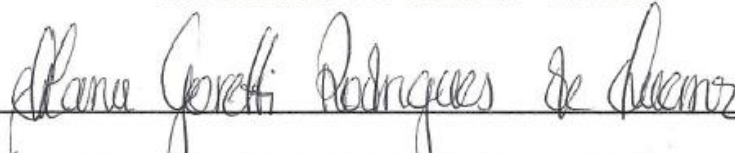
Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC



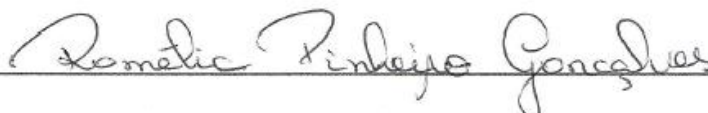
Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR



Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Raimundo e Cândia, que me educaram com valores e princípios de que devemos pautar a vida com amor, paz e respeito ao próximo. A eles agradeço a oportunidade de sempre acreditarem na minha dedicação aos estudos. Obrigado pela torcida incontestável.*

*A minha princesinha, Juliana, que ilumina meus caminhos e está sempre ao meu lado na árdua tarefa de enfrentar a vida. Esta tese tem um pouco de sua personalidade.*

*“...se eu pudesse amar, eu mudava a natureza, acabava com a tristeza, pra nunca mais te ver chorar...teus olhos são a poesia que no dia-a-dia eu guardo pra compor...”*

*Agêpê & Canário*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por que ele é o começo, o meio e o fim de todas as coisas.

Aos meus pais Raimundo Aguiar e Cândida Pereira, por sua compreensão e apoio, mesmo diante da distância.

Aos meus irmãos: Carlos, Socorro, Daniel, Regina, Raimundo Júnior, Cláudio e Fernando, que de alguma forma me ajudaram a conquistar meus objetivos.

Em destaque a minha irmã Regina e ao meu cunhado Tomás, que estiveram ao meu lado no início desta caminhada me dando todo apoio e suporte.

A amada e eterna avô, mesmo distante passava fé e esperança para que pudéssemos acreditar na vida e sermos honesto.

A sempre amável e carinhosa Francisca (titia) e Socorro (bebeca ou viúva).

A minha orientadora, Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelas orientações, paciência e empenho a mim dedicado durante o doutorado. Um exemplo de mulher guerreira, com coração meigo e carinhoso.

A professora Maria Goretti R. de Queiroz, grande incentivadora para que eu segui-se a carreira acadêmica, conterrânea de coração a quem devo as palavras de apoio e crescimento como ser humano e profissional.

Ao professor Dr. Everardo Menezes, obrigado pela recepção no laboratório de microbiologia e por ter me orientado na iniciação científica, devo a você a visão

crítica da pesquisa...você foi responsável por ter aberto as portas da academia.  
Obrigado meu eterno orientador!

Ao professor Alexandre Havt, sempre dedicado e solícito na arte de ensinar,  
obrigado pelos ensinamentos em Biologia Molecular.

A grande amiga Renatinha, pelas ajudas e dedicação no decorrer da vida  
acadêmica. Hoje, professora Dra. Renata Alves.

Obrigado Professor Dr. René Duarte, com suas sátiras inteligentes sempre nos  
ajudou fazer ciência com humor e leveza.

Ao meu grande amigo de graduação e pós-graduação Carlos Filho, que de  
alguma forma me ajudou durante a faculdade.

Professora Alice Martins, obrigado pelas palavras de incentivo.

Aos colegas de pós-graduação do LFAVET: Rafael Jorge, Roberta Jeane,  
Claudênio, Marta, Fabíola Carine, Profa. Alcínia, Profa. Marinetes, Antônio Gomes  
Neto, Diogo Augusto, Pedro e Dalvane.

Aos alunos de IC que conheci no LFAVET, todos eles: Caio Abner, Natasha,  
João Paulo Saraiva, João Victor, Pedro, João Paulo Barbosa, Aline Sampaio,  
Aline Araújo, Marcelo, Paula, foi um prazer conhecê-los.

Obrigado Bia (Beatriz Serra Azul)!

Agradecimento especial para o grande amigo Rafael Ximenes, um caro super  
inteligente e amigo.

Dr. Daniel Freire, amigo e companheiro, obrigado pelo apoio e orientações durante a caminhada do doutorado.

Sílvia Freire e Sr. Bento, obrigado pela dedicação nas determinações bioquímicas e pelos animais utilizados nos experimentos, se não fossem vocês nada disso existiria. Obrigado por todas as horas de dedicação!

Ao grande mestre Professor Dr. Célio, obrigado pelos ensinamentos científicos e éticos.

A farmacêutica e amiga Dra. Adriana Matos, pelos ensinamentos a mim dedicados, os quais me engrandeceram profissionalmente. Em especial a Dra. Socorro Sena pelas orientações em análises clínicas e especial em microbiologia.

Terezinha Brito, Ramon e Ticiano Praciano, obrigado pela parceria nos experimentos de aorta e MDCK. Estarei sempre à disposição.

Aos secretários Karine Ribeiro e Paulo Wanderson do Programa de Pós Graduação da RENORBIO pela colaboração durante a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de auxílio para execução deste projeto.

Agradeço a todos os meus professores e colegas da graduação e pós-graduação, obrigado por tudo!

A quem eu esqueci, peço minhas desculpas, mas todos foram muito importantes para esse trabalho! Obrigado por tudo!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução e conclusão deste trabalho, muito obrigado!

*Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.*

*Paulo Freire*

## RESUMO

O aumento dos acidentes envolvendo abelhas africanizadas no Brasil e em toda a América, nas últimas décadas, passou a ser objeto de vigilância das autoridades sanitárias, devido ao fato dos acidentes com centenas de abelhas estarem associadas a quadros de envenenamento. O veneno da abelha *Apis mellifera* é uma mistura de peptídeos tóxicos com diversas ações locais e sistêmicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da abelha *A. mellifera* e de suas frações PLA<sub>2</sub> e melitina. Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300g), cujos rins foram isolados e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificado contendo 6g% de albumina bovina previamente dialisada. A avaliação dos efeitos vasculares do veneno de *Apis mellifera* em vasos de condutância foi realizada através dos ensaios em anel de aorta isolado de rato. Os resultados encontrados demonstraram que o veneno total de *A. mellifera* e da fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) promoveram alterações significativas em todos os parâmetros renais estudados, produzindo um aumento na pressão de perfusão renal (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG), todas essas alterações foram verificadas nas concentrações de 3µg/mL e 10µg/mL. Porém, a menor concentração (1µg/mL) não apresentou efeito nos parâmetros avaliados. Foi verificada uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>), sugerindo que o veneno total e a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) exerçam injúria sobre os túbulos renais. Também foram observadas depósito de proteínas nos túbulos renais nas análises histológicas com regiões focais de necrose/apoptose, bem como foi constatada redução da viabilidade das células MDCK e do aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH), cujo efeito citotóxico dependente de concentração com um valor de IC<sub>50</sub> 47.84µg/mL. Nesse sentido, os resultados sugerem que as lesões renais foram por necrose nas condições testadas. Foi demonstrado no protocolo de anel de aorta um aumento na contratilidade. Em conclusão, o veneno total e a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera* causaram nefrotoxicidade, sugestivo de uma ação direta com morte celular em células do túbulo renal por necrose. O efeito contrátil do veneno de abelha envolve a abertura de canais de cálcio operados por voltagem e sugerem a participação dos receptores alfa adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C. Esse achado corrobora com os resultados encontrados em rim isolado de rato, verificando-se um aumento da pressão de perfusão renal devido a uma possível vasoconstrição dos vasos que irrigam o rim. Os estudos do veneno e suas frações em diferentes sistemas propiciam um maior conhecimento da fisiopatologia e uma elucidação dos mecanismos observados. Desta forma, pode levar à descoberta e bioprospecção de ferramentas farmacológicas em componentes presentes no veneno.

**Palavras-chave:** Venenos de abelhas, Rins, Vasos sanguíneos.

## ABSTRACT

The increase in accidents involving Africanized bees in Brazil and throughout Latin America in recent decades has become the object of surveillance by the health authorities, because of accidents with hundreds of bees to be associated with frames of poisoning. The venom of the honeybee *Apis mellifera* is a mixture of toxic peptides with various local and systemic actions. The objective of this study was to evaluate the renal and vascular changes promoted by the whole venom of the bee *A. mellifera* and its fractions PLA<sub>2</sub> and melittin. Male Wistar rats (250-300g) whose kidneys were isolated and perfused with Krebs-Henseleit solution containing modified 6g% bovine albumin previously dialyzed. The evaluation of the vascular effects of the venom of *Apis mellifera* in pots was carried out using conductance tests ring of isolated rat aorta. The results showed that the whole venom of *A. mellifera* and the complexed fraction (PLA<sub>2</sub>+melittin) promoted significant changes in all renal parameters studied, producing an increase in renal perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (FU) and the glomerular filtration rate (GFR), all these changes were seen at concentrations of 3µg/mL and 10µg/mL. However, the lower concentration (1µg/mL) had no effect on the evaluated parameters. It was observed a significant reduction in the percentage of tubular transport of sodium (Na<sup>+</sup>), potassium (K<sup>+</sup>) and chloride (Cl<sup>-</sup>), suggesting that the whole venom and the fraction complexed (PLA<sub>2</sub>+melittin) engaged on the renal tubular injury. Were also observed in protein deposition in the renal tubules histological focal regions with necrosis/apoptosis, and was found reduced the viability of the MDCK cells and an increased of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), whose concentration dependent cytotoxic effect with a value IC<sub>50</sub> 47.84µg/mL. In this sense, the results suggest that the renal lesions were necrosis in the tested conditions. It had been shown in the protocol of aortic ring an increase in contractility. In conclusion, the whole venom and the fraction complexed (PLA<sub>2</sub>+melittin) of bee *Apis mellifera* caused nephrotoxicity, suggesting a direct action on cell death in renal tubule cells by necrosis. The contractile effect of bee venom involves the opening of calcium channels operated by voltage and suggest a role of alpha adrenergic receptors via activation of phospholipase C. This finding confirms the results found in the isolated rat kidney and there was an increase in pressure due to renal perfusão possible vasoconstriction of the vessels supplying the kidney. Studies of the venom and its fractions in different systems provide a greater understanding of the pathophysiology and an elucidation of the mechanisms observed. Thus, it can lead to the discovery of pharmacological tools and bioprospecting in the components present in the venom.

**Key words:** Bee venoms, Kidneys, Blood vessels.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%TCI<sup>-</sup> - percentual de cloreto transportado

%TK<sup>+</sup> - percentual de potássio transportado

%TNa<sup>+</sup> - percentual de sódio transportado

%TpCl<sup>-</sup> - percentual de cloreto proximal transportado

%TpK<sup>+</sup> - percentual de potássio proximal transportado

%TpNa<sup>+</sup> - percentual de sódio proximal transportado

μEq.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - miliequivalente por grama por minuto

® - marca registrada

μg/mL - micrograma por mililitro

A - adenina

AA – Abelha africanizada

Ach - acetilcolina

AT1 – receptor de angiotensina II

BPF – Fator potencializador de bradicinina

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

CA - Califórnia

CE<sub>50</sub> - Concentração necessária para se observar 50% dos efeitos

CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

ECl<sup>-</sup> - potássio excretado

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

$E_{K^+}$  - potássio excretado

$E_{MAX}$  - efeito máximo

$E_{Na^+}$  - sódio excretado

EPM - erro padrão da média

EUA - Estados Unidos da América

$F_{Cl^-}$  - cloreto filtrado

$F_{K^+}$  - potássio filtrado

$F_{Na^+}$  - sódio filtrado

FPR - fluxo de perfusão renal

FU - fluxo urinário

xG - força da gravidade

gF - grama-força

HE - hematoxilina-eosina

Ig E – Imunoglobulina E

IRA - insuficiência renal aguda

$K^+$  - potássio

KCl - cloreto de potássio

kDa – kilo dalton

$KH_2PO_4$  - fosfato de magnésio dibásico

LCC - Laboratório de cultivo celular

L/h - litros por hora

LFAVET - Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas

LDH - enzima lactato desidrogenase

$MgCl_2$  - cloreto de magnésio

MDCK - *Madin-Darby canine kidney* - células caninas renais de *Madin Darby*

mg - miligrama

mg/Kg - miligrama por kilograma

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - sulfato de magnésio heptahidratado

min - minuto

mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - mililitro por grama por minuto

mL/min - mililitros por minuto

mM - milimolar

mmHg - milímetros de mercúrio

mmHg. mL<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - milímetros de mercúrio por mL por grama por minuto

MO - Missouri

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio

n - letra que representa o número da amostra estudada

nm - nanômetros

NaCl - cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de sódio dibásico

NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio

NO - óxido nítrico

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

p/v - peso por volume

PBS - tampão fosfato - *phosphate buffer solution*

PE-30 - tubo de polietileno número 30

pg - picograma

pH - potencial hidrogeniônico

Posm - osmolaridade do perfusato

PP - pressão de perfusão

PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>

RFG - ritmo de filtração glomerular

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RVR - resistência vascular renal

SBF - soro bovino fetal

TCI<sup>-</sup> - cloreto transportado

TK<sup>+</sup> - potássio transportado

TNa<sup>+</sup> - sódio transportado

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UNESP - Universidade Estadual de São Paulo

USP – Universidade de São Paulo

Uosm - osmolaridade urinária

U/L - Unidade internacional por litro

VAM - veneno de *Apis mellifera*

U-73122 – Inibidor de fosfolipase C

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação taxonômica da abelha <i>Apis mellifera</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 3.</b> Fotografia de abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 4.</b> Cabeça da abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 5.</b> Foto de abelha demonstrando os aspectos da anatomia interna de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b> Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.....	<b>56</b>
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado .....	<b>57</b>
<b>Figura 8.</b> Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>58</b>
<b>Figura 9.</b> Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema.....	<b>58</b>
<b>Figura 10.</b> Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>59</b>
<b>Figura 11.</b> Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado .....	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas .....	<b>61</b>
<b>Figura 13.</b> Identificação (A) e canulação (B) do ureter .....	<b>62</b>
<b>Figura 14.</b> Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C). .....	<b>63</b>
<b>Figura 15.</b> Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica .....	<b>63</b>

<b>Figura 16.</b> Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.....	<b>64</b>
<b>Figura 17.</b> Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados .....	<b>67</b>
<b>Figura 18.</b> Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b> Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	<b>72</b>
<b>Figura 20.</b> Visualização do segmento torácico da aorta .....	<b>73</b>
<b>Figura 21.</b> Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado.....	<b>74</b>
<b>Figura 22.</b> Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares .....	<b>74</b>
<b>Figura 23.</b> Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada...	<b>75</b>
<b>Figura 24.</b> Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato.....	<b>75</b>
<b>Figura 25.</b> Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.....	<b>76</b>
<b>Figura 26.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) na pressão de perfusão renal (PP). .....	<b>82</b>
<b>Figura 27.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) na resistência vascular renal (RVR) .....	<b>84</b>
<b>Figura 28.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no fluxo urinário (FU). .....	<b>86</b>
<b>Figura 29.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no ritmo de filtração glomerular (RFG) .....	<b>88</b>
<b>Figura 30.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ).....	<b>90</b>

<b>Figura 31.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) .....	<b>92</b>
<b>Figura 32.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ).....	<b>94</b>
<b>Figura 33.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> na pressão de perfusão renal (PP).....	<b>97</b>
<b>Figura 34.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> na resistência vascular renal (RVR) .....	<b>99</b>
<b>Figura 35.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> no fluxo urinário (FU).....	<b>101</b>
<b>Figura 36.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> no ritmo de filtração glomerular (RFG). .....	<b>103</b>
<b>Figura 37.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ).....	<b>105</b>
<b>Figura 38.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) .....	<b>107</b>
<b>Figura 39.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ) .....	<b>109</b>
<b>Figura 40.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais .....	<b>111</b>
<b>Figura 41.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais.....	<b>112</b>
<b>Figura 42.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos normais.....	<b>113</b>
<b>Figura 43.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais .....	<b>114</b>

- Figura 44.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (1µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais ..... **115**
- Figura 45.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (3,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais ..... **116**
- Figura 46.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (10,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais..... **117**
- Figura 47.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (3µg/mL) demonstrando túbulos dilatados, depósitos hialinos formando cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular ..... **118**
- Figura 48.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando túbulos dilatados com depósito intertubular, verdadeiros cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular .. **119**
- Figura 49.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de material protéico, indicativos de morte celular..... **120**
- Figura 50.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de substância eosinofílica ..... **121**
- Figura 51.** Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL) ..... **123**

<b>Figura 52.</b> Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle .....	<b>125</b>
<b>Figura 53.</b> Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno de <i>Apis mellifera</i> , (50,0 µg/mL), presença de agrupamento celular e citoplasma granuloso e demonstrando o padrão de morte celular observado, onde A representa as células expostas ao VAM.....	<b>126</b>
<b>Figura 54.</b> Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).....	<b>127</b>
<b>Figura 55.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca <sup>2+</sup> 1mM e na ausência de Ca <sup>2+</sup> 1mM. ....	<b>130</b>
<b>Figura 56.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem fentolamina e na presença de fentolamina .....	<b>131</b>
<b>Figura 57.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem verapamil e na presença de verapamil.....	<b>132</b>
<b>Figura 58.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem losartanl (●, n=5; 0,1-50µg/mL) e na presença de losartan	<b>133</b>
<b>Figura 59.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem inibidor de fosfolipase C e na presença de inibidor de fosfolipase C.....	<b>134</b>
<b>Figura 60.</b> Curva concentração-efeito em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca <sup>2+</sup> 1mM com veneno total de <i>Apis mellifera</i> , com a fração complexada PLA <sub>2</sub> + melitina, com a fração isolada de PLA <sub>2</sub> e melitina .....	<b>135</b>
<b>Figura 61.</b> Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado .....	<b>136</b>

<b>Figura 62.</b> Fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone.....	<b>167</b>
<b>Figura 63.</b> Mecanismos celulares envolvido na contração.....	<b>170</b>
<b>Figura 64.</b> Localização anatômica da artéria e veia femoral e posicionamento dos cateteres arterial (vermelho) e venoso (azul). .....	<b>172</b>
<b>Figura 65.</b> Traçado do efeito de diferentes concentrações de <i>Apis mellifera</i> (1-100µM) na pressão arterial de ratos “in vivo” .....	<b>174</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **83**
- Tabela 2.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL. .... **85**
- Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **87**
- Tabela 4.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **89**
- Tabela 5.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **91**
- Tabela 6.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **93**
- Tabela 7.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl<sup>-</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **95**
- Tabela 8.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **98**

**Tabela 9.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **100**

**Tabela 10.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **102**

**Tabela 11.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL..... **104**

**Tabela 12.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **106**

**Tabela 13.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **108**

**Tabela 14.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **110**

**Tabela 15.** Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno da serpente *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL). ..... **124**

**Tabela 16.** Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de ( 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL). ..... **128**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>30</b>
1.1	Considerações gerais .....	31
1.2	Epidemiologia dos acidentes causados por abelhas .....	33
1.3	Família <i>Apidae</i> : taxonomia e distribuição geográfica.....	36
1.4	Características da família <i>Apidae</i> .....	39
1.5	Composição química do veneno de abelha .....	44
1.6	Efeitos clínicos do veneno de abelha .....	47
1.7	Justificativa .....	50
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>52</b>
2.1	Geral.....	53
2.2	Específicos .....	53
<b>3</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>54</b>
3.1	Animais de experimentação.....	55
3.2	Veneno, fármacos e reagentes utilizados.....	55
3.3	Células MDCK .....	55
3.4	Perfusão de rim isolado .....	56

3.4.1 Sistema de perfusão renal .....	56
3.4.2 Calibração do sistema .....	57
3.4.3 Solução perfusora.....	59
3.4.4 Técnica cirúrgica.....	59
3.4.5 Protocolo experimental .....	65
3.4.5.1 Veneno total.....	65
3.4.5.2 Frações complexada (PLA <sub>2</sub> + melitina).....	66
3.4.6 Análises bioquímicas .....	65
3.4.7 Cálculos dos parâmetros renais avaliados .....	66
3.4.8 Estudo histológico renal.....	68
3.5 Ensaio com cultura de célula .....	69
3.5.1 Cultivo das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) .....	69
3.5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	69
3.6 Anel de aorta .....	73
3.6.1 Técnica cirúrgica .....	73
3.6.2 Protocolos experimentais .....	76
3.6.2.1 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	77
3.6.2.2 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> em meio livre de cálcio na presença de EGTA.....	77
3.6.2.3 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> em meio com fentolamina, verapamil, losartan e inibidor da fosfolipase C (U- 73122) .....	77
3.6.2.3 Efeito das frações PLA <sub>2</sub> e melitina isolados, e efeito do complexo da fração (PLA <sub>2</sub> + melitina) do veneno de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	78

3.7.3 Estudo histológico dos anéis de aorta.....	78
3.8 Análises estatísticas .....	78
3.9 Aspectos éticos.....	79
<b>4 Resultados.....</b>	<b>80</b>
4.1 Perfusão renal .....	81
4.1.1 Perfusão renal do veneno total.....	81
4.1.2 Perfusão renal com as frações PLA <sub>2</sub> +mellitina.....	96
4.1.2 Histologia dos rins perfundidos .....	111
4.2 Ensaio com cultura de células .....	122
4.2.1 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade .....	122
4.3 Anel de aorta com endotélio .....	129
4.3.1 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na tensão basal de aorta isolada na presença e na ausência de cálcio .....	129
4.3.2 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de fentolamina.....	131
4.3.3 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de verapamil.....	132
4.3.4 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de losartan.....	133

4.3.5 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de inibidor da fosfolipase C (u – 73122).....	134
4.3.6 Efeito das frações PLA <sub>2</sub> e melitina isoladas, e efeito do complexo de fração (PLA <sub>2</sub> + melitina) do veneno de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	135
4.4 Histologia dos anéis de aorta.....	136
<b>5 Discussão dos resultados .....</b>	<b>137</b>
<b>6 Considerações finais .....</b>	<b>149</b>
<b>7 Conclusão .....</b>	<b>152</b>
<b>8 Referências bibliográficas.....</b>	<b>155</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>165</b>

# INTRODUÇÃO

*A teoria sem a prática vira 'verbalismo', assim como a prática sem teoria, vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.*

*Paulo Freire*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde o tempo dos Hebreus, Gregos e Egípcios, há relatos da importância econômica dos insetos sociais (WILSON, 2007). No entanto, somente dezenove séculos após o início da Era Cristã (ou Era Comum), os venenos desses animais despertaram interesses de pesquisadores (SPRADBERY, 1973).

O Brasil é um país com características climáticas e geográficas muito variadas, possuindo assim, uma ampla diversidade biológica. Desta forma, é considerado como um ambiente rico para diversos estudos com produtos naturais, os quais constituem uma fonte de novos compostos para serem utilizados na terapêutica (PALMA *et al.*, 2012).

Os insetos são os mais numerosos grupos de animais da biosfera, podendo ser classificados de acordo com suas relações com o homem em insetos úteis e nocivos (GARCIA, 1999). Juntamente com os crustáceos e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, mas somente a Classe *Insecta* possui diversidade maior que qualquer outro animal terrestre já descrito até os dias de hoje (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

Os insetos possuem uma diversidade química em seu veneno, que é utilizado na defesa contra predadores. Em geral, os insetos possuem a capacidade de metabolizar compostos orgânicos oriundos de plantas, que são adquiridos durante sua dieta alimentar, e esses compostos tornam-se potencialmente úteis no mecanismo de defesa (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

As abelhas pertencem ao filo *Artrópoda* (do grego *arthros* ou articulação + *podos* ou pé), à classe *Insecta* e à Ordem Hymenoptera. A classe *Insecta* é composta por mais de um milhão de espécies, apresentando os mais importantes invertebrados, que podem viver em ambientes secos e úmidos. A ordem *Hymenoptera* é formadora de mais de 200.000 espécies, da qual possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica

são causados por membros pertencentes às famílias *Apidae* (abelhas), *Formicidae* (formigas) e *Vespidae* (vespas). Há também um grande interesse em estudos relacionados à caracterização química, aos mecanismos de ação e à farmacologia dos componentes das peçonhas de insetos dessa Ordem Hymenoptera (STEEN *et al.*, 2005).

Acidentes por abelhas são bastante comuns e em geral têm curso benigno. Entretanto, eventualmente, podem surgir complicações mais graves. É uma característica importante nas fêmeas dos himenópteros, a presença de ferrão ou agulhão, que é uma eficiente arma de ataque e defesa. São característicos nos acidentes por abelhas, os ferrões com as glândulas produtoras de veneno permanecem na pele após a picada (LEÃO, 1997).

Os aspectos fisiopatológicos, epidemiológicos e ambientais de grupos de artrópodes, como aranhas, insetos e centopéias em regiões tropicais, são escassos de estudos na literatura. O conhecimento limitado e a benignidade clínica de acidentes envolvendo artrópodes contribuem para a subnotificação. Estudo realizado no Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco (CEATOX) verificou que as notificações envolvendo abelhas foram as mais frequentes, com 37,4% dos casos, seguidas de centopéias, com 18,9%, percebendo-se uma tendência de aumento no registro de casos ao longo dos anos (FREITAS *et al.*, 2006).

Diante da necessidade de se estudar as ações e os aspectos envolvendo os venenos produzidos pelos animais peçonhentos, confirma-se que a Toxinologia, a ciência que trata do estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas, animais e suas consequências no organismo humano, é uma ciência em contínua expansão no Brasil e no mundo. Estão inseridos nesse contexto as plantas tóxicas, as bactérias, os fungos produtores de toxinas, as serpentes, escorpiões, abelhas, vespas, formigas, animais marinhos e aranhas (SOARES, 2005).

As toxinas são produzidas com o intuito de defesa contra possíveis presas e inimigos, mas por outro lado, podem ser essenciais para novas aplicabilidades terapêuticas, pois contribuir para a descoberta de ferramentas farmacológicas e para a compreensão do seu mecanismo de ação, proporcionando a melhoria nos

protocolos de tratamento de pacientes envolvidos em acidentes com esses seres vivos (LEWIS; GARCIA, 2003). Estudos com toxinas de origem animal também têm contribuído muito na compreensão de problemas vasculares, neurológicos, processos inflamatórios, analgesias, processos alérgicos, asma e outros, pois venenos de invertebrados apresentam grande importância devido à sua ação bioativa (MORTARI *et al.*, 2007).

Como um marco científico das toxinas na descoberta de fármacos, destaca-se o agente terapêutico Captopril, o qual age inibindo a enzima conversora de angiotensina. Esse achado foi iniciado pelos estudos de Rocha e Silva *et al.* (1949), culminando com as pesquisas de Sérgio Ferreira, que isolou a molécula conhecida como fator potencializador da bradicinina (BPF), substância com atividade vasodilatadora e hipotensiva presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca*. A partir desse momento, deu-se o ponto de partida para o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos anti-hipertensivos (FERREIRA, 1965). Finalmente, os estudos para o desenvolvimento da molécula final do Captopril foram feitos por Cushman e Odentii (LEWIS; GARCIA, 2003).

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES CAUSADOS POR ABELHAS**

O aumento dos acidentes envolvendo abelhas africanizadas no Brasil e em toda a América, nas últimas décadas, passou a ser objeto de vigilância das autoridades sanitárias, devido ao fato de acidentes com centenas de abelhas estarem associadas não somente a relatos de processos alérgicos, mas também a quadros de envenenamento. Uma das complicações sistêmicas mais severas após um acidente por abelhas é a insuficiência renal aguda (IRA), que além de ser algo bastante grave, é um quadro comum nos casos em que o paciente evolui ao óbito. O crescente número de casos de óbitos alerta para a necessidade de se dispor de um tratamento eficaz (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

Os dados disponíveis sobre acidentes com animais peçonhentos no Brasil eram obtidos, até a década de 80, geralmente, através de relatos e não se conhecia a incidência desses acidentes, pois os dados epidemiológicos eram dispersos e incompletos, porém a hipersensibilidade provocada por picada de insetos era estimada, na literatura médica, em valores de 0,4% a 10% nas populações estudadas (BRASIL, 2001).

Os acidentes provocados por aranhas, escorpiões, abelhas, vespas e outros animais peçonhentos de interesse médico-sanitário passaram a ser de notificação obrigatória, a partir de 1988, fazendo parte do Programa de Controle dos Acidentes por voluntário (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

Na Europa, a prevalência de indivíduos alérgicos a venenos de Hymenoptera é de aproximadamente 20% e a incidência de casos fatais varia de 0,1 a 0,5 por milhão de habitantes por ano, resultando em cerca de 100 mortes / ano. Em relação aos acidentes causados por ferroadas de Hymenoptera, 32,6% dos acidentes são ocasionados por vespas, 28,2% por abelhas e 26,8% por formigas (ESCHER *et al.* 2001).

Desde 1993, na ficha de investigação do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da secretaria de Saúde de São Paulo, nos casos de acidentes ocasionados por animal peçonhento, as abelhas passaram a constar como “animal agressor”, tendo sido registradas 30.292 notificações de acidentes no período compreendido entre os anos de 1993 a 1997. Dessas notificações, na média para todo o período, 6,3% ocorreram por causa de himenópteros, dos quais 89,7% eram abelhas africanizadas (MELLO *et al.*, 2003).

Em relação à incidência de acidentes causados por Hymenoptera, mais especificamente as abelhas, grande parte ocorre na zona rural, e em países tropicais, a sensibilização ocasionada por venenos dessa Ordem ocorre em 9,3 a 28,5% dos indivíduos acidentados (ANTONICELLI *et al.*, 2002).

Foram verificados, em 2008, no Brasil, que, de um número de 94.584 acidentes causados por animais peçonhentos, a totalidade de casos de acidentes por abelhas foi de 5.605 e a letalidade foi de 0,23%. Esse número total de acidentes representou uma incidência nacional de 3/100.000 habitantes, podendo-se destacar a região Sul como a que apresentou a maior incidência dentre as regiões do país (5,8/100.000 habitantes) (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

No Ceará, os dados atuais da secretaria de saúde relatam que entre os anos de 2007 a 2011, ocorreram 8.619 casos de acidentes por animais peçonhentos, e, dentre eles, 775 casos foram ocasionados por abelhas, ou seja, aproximadamente 9,0%. Desse número total de acidentes causados por abelhas, 62% foram relacionados ao sexo masculino; a faixa etária mais acometida foi a de 20 à 59 anos de idade, representando 60 % dos acidentes, e, 88 % dos casos foram de pacientes originados do interior do Estado. O número total de óbitos por picadas de abelhas nesse período foi de 21 casos (SINAN/SESA/CE, 2012).

As notificações da vigilância epidemiológica nos acidentes por animais peçonhentos devem constituir o alicerce para formulação de estratégias que permitam, a partir do patamar atual, iniciar o declínio da tendência ascendente dos casos de acidentes por abelhas africanizadas (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

A importância que envolve o tema se revela na qualidade dos dados epidemiológicos, verificando-se a urgente capacitação de profissionais que realizam a assistência aos pacientes e dos responsáveis pela vigilância e sistema de informações no âmbito dos Estados e Municípios. Dessa forma, o aumento crescente nas notificações de acidentes por abelhas retrata a necessidade de uma maior descentralização das ações de saúde, pois na medida em que isso ocorre, aumenta a efetividade da vigilância e do controle dos casos.

### 1.3 FAMÍLIA APIDAE: TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os himenópteros são uma ordem de insetos que inclui abelhas, formigas e vespas. Em relação à taxonomia, insere-se as abelhas de acordo com a figura 01.



**Figura 1.** Classificação taxonômica da abelha *Apis mellifera* (NOGUEIRA-NETO, 1972).

As abelhas de gênero *Apis* e espécie *Apis mellifera* são de grande importância econômica e são divididas em várias subespécies. Tendo em vista o crescimento da apicultura, foram trazidas para o Brasil várias sub-espécies, senão vejamos:

A abelha *Apis mellifera mellifera* foi introduzida em 1839 e tem a sua origem no Norte e Oeste dos Alpes Europeus e Rússia Central. É conhecida popularmente como abelha do reino, da Europa ou abelha preta. Antes da introdução das abelhas africanas, a *Apis mellifera mellifera* era a raça predominante no Brasil. Como

particularidade, esses insetos são grandes, têm a coloração preta, possuem abdômen largo e o corpo recoberto de pêlos (NOGUEIRA-NETO, 1972).

A *Apis mellifera ligustica*, sub-espécie essa que além de ser conhecida como abelha italiana, é a mais cultivada no mundo. Essas abelhas, que foram introduzidas no Brasil em 1870, pelo apicultor Frederico Hanneman, apresentam como característica importante em seu corpo uma coloração amarelo ouro, coberta por pêlos compridos. No zangão, a cor é mais acentuada e uniforme, já a rainha pode ser facilmente localizada entre as operárias. As abelhas italianas são mansas e de fácil manuseio, por isso ficam calmas nos favos e são pouco enxameadoras (FRANÇA *et al.*, 1994).

A *Apis mellifera adansonii* tem origem no continente Africano e foi introduzida no Brasil em 1956. Relata-se que seu comportamento é bem diferente quando comparado ao das abelhas européias. As africanas são muito agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Apresentam porte menor, cor amarelo-limão no abdômen e listas negras transversais que vão aumentando de largura até formar uma parte negra e brilhante (NOGUEIRA-NETO, 1972).

A *Apis mellifera scutellata* originária também do continente Africano, foi introduzida no Brasil na região de Rio Claro-SP, em 1956, para fins científicos, mas acabou escapando do apiário para a natureza, alastrando-se para todo o continente. No cruzamento com as raças européias aqui existentes, produziu um “híbrido” que passou a ser chamado de abelha africanizada. Assim como a *Apis mellifera adansonii*, essas abelhas são agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Como diferencial, a *Apis mellifera scutellata* é bastante produtiva e madrugadeira, pois trabalha até o final do dia, mas são migratórias. Apresentam porte pequeno e cor amarelada nos zangões e nas operárias (BUCHMANN, NABHAN, 1996).

Como parte de um programa de cruzamentos, abelhas produtoras de mel foram trazidas da Tanzânia, na África, para o Brasil em 1956. O pesquisador Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr propôs-se a produzir um “híbrido” que fosse mais apropriado para atender ao mercado de produção de mel nacional, já que as abelhas européias eram as que até então habitavam o país e as que mais

produziam mel, no entanto não toleravam o clima quente. Sendo assim, o principal objetivo do projeto era conseguir abelhas que sintetizassem a quantidade de mel produzida pelas abelhas européias, mas que ao mesmo tempo tolerassem o clima quente, como as abelhas africanas (KERR, 1967).

Em março de 1957, vinte e seis enxames das abelhas africanas importadas, escaparam das colméias em cruzamento, e, atualmente, as abelhas encontradas no Brasil são esses “poli-híbridos”, conhecidos como abelhas africanizadas, que foram resultantes dos cruzamentos entre *Apis mellifera scutellata* e as seguintes sub-espécies: *A. m. mellifera*, vinda do norte da Europa; *A. m. ligustica*, proveniente da Itália; *A. m. caucásica*, encontrada na Rússia e repúblicas transcaucasianas; e *A. m. carniça*, encontradas na Península Balcânica (STORT; GONÇALES, 1994).

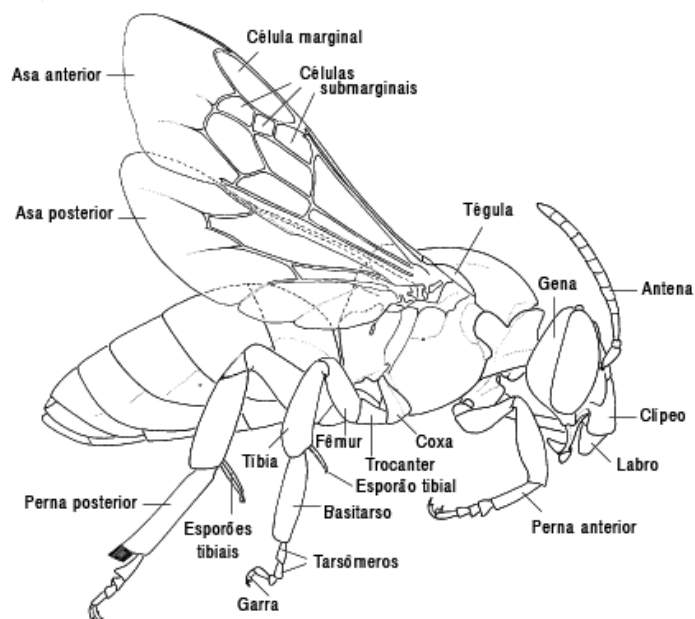
Essas abelhas espalharam-se rapidamente do Brasil para áreas distantes como Argentina, Texas, Arizona, Novo México, Califórnia e Nevada. Muitos especialistas acreditam que as abelhas africanizadas (AA), que apresentam como característica um comportamento agressivo, continuarão a migrar, podendo tornar-se “endêmicas” no Sul dos EUA, incluindo os estados da Louisiana, Mississipi, Alabama, Flórida e partes da Geórgia, representando um grave problema para a saúde pública (SCHUMACHER, EGEN, 1995; KAPLAN, 2006).

O deslocamento dessas abelhas, oriundo dos cruzamentos, foi mais rápido no Nordeste do Brasil, aproximadamente 500 km/ano, onde o clima é tropical seco; de 200 a 250 km/ano em clima úmido, tais como florestas tropicais da Bacia Amazônica e Guianas; em direção ao Paraguai e Bolívia foi de aproximadamente 150 km/ano e tornou-se zero após os paralelos 33 e 34, entre as províncias de Entre Rios, Santa Fé, Córdoba na Argentina e São Luiz no Maranhão (FUNASA, 2009).

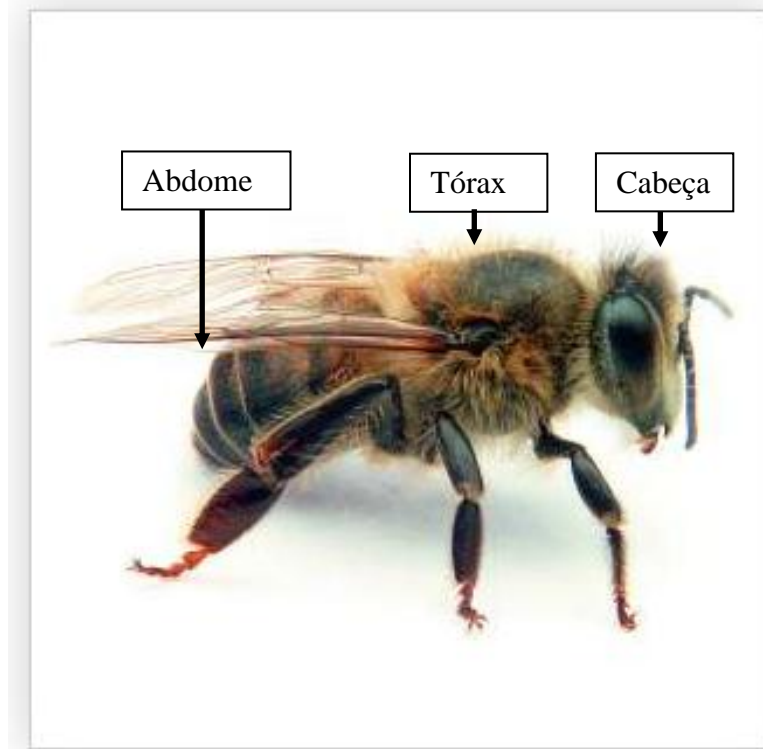
## 1.4 CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA APIDAE

A camada externa do corpo das abelhas, como em todos os artrópodes, é formada pela cutícula. A cutícula é seu exoesqueleto, estrutura essa que tem as funções de proteger os órgãos internos, evitar a perda de água e dar sustentação para os músculos. O exoesqueleto não é uma camada contínua, mas constitui-se de placas rígidas de espessura variável, unidas umas às outras ou conectadas por áreas membranosas que conferem elasticidade e flexibilidade ao corpo (FREE, 1980).

O corpo das abelhas, como o de todos os insetos, constitui-se também de três partes principais (tagmas ou tagmata): cabeça, tórax e abdome (Fig. 02 e 03). No caso das abelhas e outros himenópteros Apocrita, como as formigas e as vespas, o primeiro segmento do abdome é unido ao tórax, recebendo o nome de propódeo. A seguir, foi descrito de forma sucinta cada uma dessas partes, destacando aquelas que apresentam maior importância para o desempenho das diversas atividades das abelhas (SILVEIRA *et al.*, 2002).

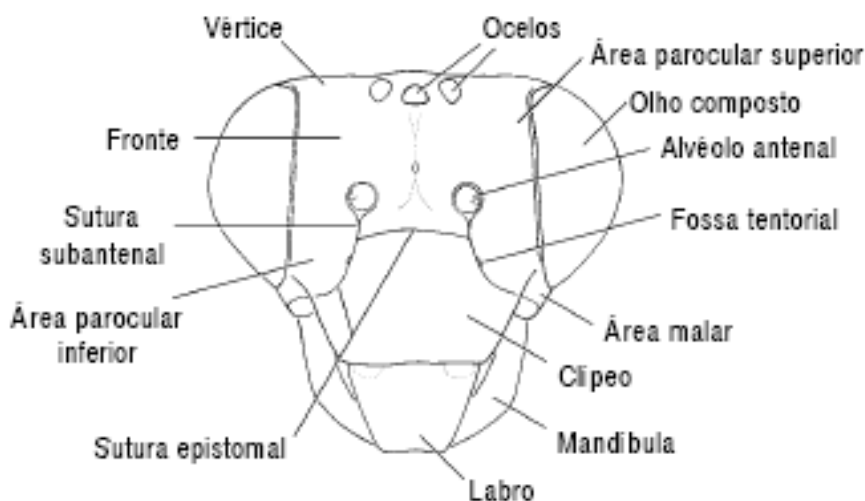


**Figura 02.** Aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).



**Figura 03.** Fotografia de abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).

A cabeça das abelhas contém dois olhos compostos laterais, três ocelos dorsais, um par de antenas, um par de mandíbulas e o aparelho bucal (Fig. 04). A cabeça pode ser dividida em diversas regiões, geralmente delimitada por suturas. A região dorsal, que fica entre os olhos compostos e os ocelos, é chamada vértice; a região anterior, localizada acima da inserção das antenas, é a fronte; a região situada entre a margem inferior dos olhos e a base das mandíbulas é a área ou espaço malar (DADE, 1994).

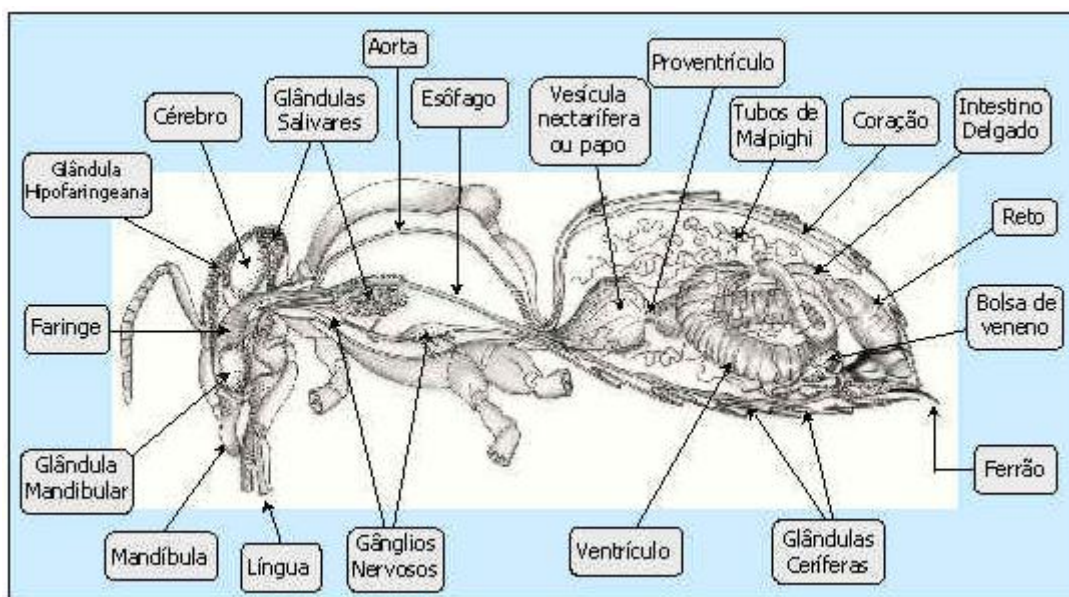


**Figura 04.** Cabeça da abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).

No tórax encontram-se os órgãos locomotores (pernas e asas), destacando-se a presença de grande quantidade de pêlos, que possuem importante função na fixação dos grãos de pólen quando as abelhas entram em contato com as flores. No tórax, também são encontrados espiráculos, que são os órgãos de respiração; o esôfago, que é parte do sistema digestório; e as glândulas salivares envolvidas no processamento do alimento (MEYER, WIESE, 1985).

As abelhas, como os demais insetos, apresentam três pares de pernas. As pernas posteriores das operárias possuem diversas funções, e dentre elas estão a de locomoção, manipulação da cera e própolis, limpeza das antenas, das asas e do corpo e também a de agrupar as abelhas quando formam "cachos". As asas desses animais são constituídas por dois pares, os quais têm uma estrutura membranosa que possibilitam o voo a uma velocidade média de 24 km/h (JAISON, 1982).

O abdome é formado por segmentos unidos por membranas bastante flexíveis que facilitam o movimento. Nesta parte do corpo, encontram-se órgãos do aparelho digestório, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa e glândulas produtoras de cera (Fig. 05) (CHAPMAN, 1998).



**Figura 05.** Foto de abelha demonstrando os aspectos da anatomia interna de *Apis mellifera* (CAMARGO, 1972).

Na parte final do abdome, encontra-se a estrutura de defesa das abelhas, o ferrão, que está presente apenas nas operárias e rainhas. O ferrão é ligado a uma pequena bolsa, onde o veneno fica armazenado. Essa bolsa é movida por músculos que além de auxiliar na introdução do ferrão e injeção do veneno, provocam contrações musculares capazes de permitir que a toxina continue sendo injetada mesmo após o ferrão ter saído da abelha. Dessa forma, o ferrão deve ser retirado o mais rápido possível, para se evitar que o veneno seja absorvido na sua totalidade (HERMAN, 1982).

Na maioria dos casos, o ferrão fica preso na superfície picada, e quando a abelha tenta voar ou sair do local após a ferroadada, ocorre uma ruptura de seu abdome e em consequência sua morte. No entanto, vale ressaltar que nas rainhas, a musculatura ligada ao ferrão é bem mais forte do que nas operárias, com o objetivo de a rainha não perder o abdome após utilizar o ferrão (CRUZ-LANDIM, ABDALLA, 2002).

Os únicos insetos que possuem ferrões verdadeiros pertencem à ordem Hymenoptera, que apresentam três famílias de importância médica: Apidae (abelhas

e mamangavas), Vespidae (vespa amarela, vespão e marimbondo ou caba) e Formicidae (formigas). As mortes relatadas por ferrões de Hymenoptera são causadas por reações de hipersensibilidade imediata, mas, o envenenamento pode também causar a morte em indivíduos não alérgicos. As reações anafiláticas devidas à picada de Hymenoptera não dependem da dose do veneno e nem do número de picadas relatado (FITZGERALD, FLOOD, 2006).

As abelhas africanizadas (AA), que são geneticamente modificadas, apresentam comportamento agressivo e perigoso (ARECHAVALETA-VELASCO, 2003), acreditando-se que isso se deve aos ferormônios isolados das AA. Sendo assim, essas abelhas são consideravelmente mais agressivas que as abelhas européias quando atacam suas vítimas (PARK, 2006; HUNT, 2003).

Esses insetos podem perseguir suas vítimas por até quatrocentos metros (SHERMAN, 1995), e, um dos fatores que facilita os ataques é que as AA tendem a escolher locais próximos a áreas populosas para estabelecer suas colméias, colméias essas que uma vez perturbadas, poderão deixar a colônia agitada por até vinte e quatro horas, permanecendo, dessa forma, seu comportamento de ataque (WINSTON, 1994; ABRAMSON, AQUINO, 2002; KAPLAN, 2006).

No momento da ferroadada, o aparelho de ferroar é autônomo, ficando preso à pele da vítima, para garantir que a quantidade total do veneno (1-10  $\mu$ L) possa ser injetada. Relata-se que o aguilhão, preso à pele, continua se contraindo por trinta a sessenta segundos, ejetando veneno e liberando odores de alarme para atrair outras abelhas para o ataque. Logo após esse ato de ferroar, dar-se-á a morte da abelha (SCHUMACHER *et al.*, 1994), pois quando o inseto for tentar voar ou sair do local ocorrerá uma ruptura de seu abdômen e conseqüentemente sua morte. (WINSTON, 1994).

Em relação às manifestações tóxicas sistêmicas, verifica-se que ocorrerão após 50 ferroadas simultâneas, mas a dose considerada letal em crianças é de 500 ferroadas, e em adultos, de 1100 (SHERMAN, 1995; SCHUMACHER, 1990).

A dose estimada de veneno de 1000 ferroadas, considerada fatal, é 1,3 mg/kg, ou 90 mg de veneno para um adulto. A fatalidade parece estar relacionada com a quantidade de veneno (expressa em miligramas) injetada na vítima, por quilograma de massa corpórea. Entretanto, algumas vítimas sobreviveram a mais de 1000 ferroadas (SHERMAN, 1995; SCHUMACHER, 1990).

## 1.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DE ABELHA

Inicialmente, os venenos de himenópteros apresentavam um pequeno uso direto na medicina moderna, mas essa situação vem mudando de forma rápida, já que mais informações estão se tornando disponíveis. Dessa forma, o estudo de venenos tem influenciado bastante as áreas da bioquímica, farmacologia e medicina moderna, pois essas toxinas oferecem boas fontes de concentrações de enzimas ativas, citotoxinas e neurotoxinas, que servem como ferramentas para o estudo do funcionamento subcelular dos sistemas nervoso e cardiovascular de mamíferos (MITCHELL, 2006).

Então, infere-se que o papel e o uso dos venenos aumentam cada vez mais à medida que novas técnicas de isolamento e identificação, e, especialmente, técnicas para a produção em massa de componentes individuais de venenos vêm sendo desenvolvidas (MITCHELL, 2006).

Em relação à composição do veneno, pode-se falar de maneira geral, que todo veneno é primariamente composto de proteínas, peptídeos e aminas, contendo fosfolipídeos, bradicinina, histamina, acetilcolina, dopamina e serotonina (PARK, 2006; SCHUMACHER, 1995). Os venenos de Hymenoptera, são compostos por aminas biogênicas, peptídeos básicos e proteínas de elevadas massas moleculares, principalmente enzimas (CASTRO, 1994; MÜLLER, 2002).

No veneno de *Apis mellifera*, as principais aminas biogênicas presentes são a histamina, a serotonina, a dopamina e a epinefrina. A histamina produz dilatação e

aumenta a permeabilidade dos capilares sanguíneos, mas em concentrações elevadas, pode causar colapso vascular. Um dos principais papéis da histamina é facilitar a difusão das toxinas nos tecidos, estando também relacionada com o processo da dor em mamíferos. Acredita-se que a serotonina, bem como a histamina, também seja um agente difusor do veneno (DOTIMAS, HIDER, 1987; OWEN, SLOSEY, 1988).

Os principais componentes protéicos do veneno de abelhas da espécie *Apis mellifera* são: fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidase e fosfatase ácida. A PLA<sub>2</sub> é um dos principais componentes imunogênicos do veneno de abelhas e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação sinérgica com a melitina (SCHUMACHER, EGEN, 1995, 1996; OWNBY, 1997). A fosfolipase A<sub>2</sub> que é de natureza glicoprotéica, hidrolisa fosfolipídeos presentes nas membranas plasmáticas, formando poros e causando, assim, a lise celular. Produtos da hidrólise (comumente ácido aracdônico) podem servir como precursores para mediadores da dor tais como: leucotrienos e prostaglandinas (DOTIMAS, HIDER, 1987).

A PLA<sub>2</sub> apresenta diversas atividades, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica e atividade de agregação de plaquetas (LANDUCCI *et al.*, 1994; HUANG E CHIANG, 1994). A liberação de lisofosfolipídeos pode desencadear padrões de acetilação para formar um fator de agregação plaquetária, um potente promotor da inflamação (VENABLE *et al.*, 1993).

O ácido hialurônico é responsável pelo preenchimento dos interstícios entre as células, possuindo propriedades adesivas e promovendo a união das células. Quando o ácido hialurônico é hidrolisado pela enzima hialuronidase, o interstício fica mais fluido, facilitando a difusão de outros componentes do veneno. Por esta razão, a hialuronidase é denominada “fator de difusão” (DOTIMAS E HIDER, 1987).

Vogt *et al* (1970) mostraram que uma combinação de melitina e PLA<sub>2</sub> lisaram eritrócitos sob condições nas quais nenhum deles atuou isoladamente. Charlotte *et al* (1997) apontaram que a melitina e a PLA<sub>2</sub> podem atuar de forma sinérgica para induzir a mionecrose das células de músculos esqueléticos. Foram relatadas por diversos autores evidências de que estes dois componentes atuam

sinergisticamente também em outras membranas biológicas e em vesículas fosfolípídicas sintéticas (MOLLAY, KREIL, 1974; FLETCHER, JIANG, 1993).

O veneno de abelhas é muito rico em peptídeos, tais como, a melitina, a apamina e o peptídeo desgranulador de mastócitos (HARVES, 1975).

A melitina é encontrada em grande quantidade e apresenta apenas 26 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 3 kDa. Este peptídeo representa cerca de 50% do peso seco do veneno de *Apis mellifera* e é seu principal componente (HABERMANN, 1972).

As principais funções fisiopatológicas da melitina são: ser responsável pela dor provocada durante a ferroada, apresentar características alergênicas, possuir atividade hemolítica, agir como fator de dispersão das toxinas do veneno, despolarizar a musculatura cardíaca, causar necrose de células musculares esqueléticas quando injetada por via intramuscular em camundongos, facilitar a entrada dos demais componentes do veneno no sistema circulatório da vítima da ferroada e dependendo da concentração no tecido, pode provocar vasoconstrição ou vasodilatação (DOTIMAS, HIDER, 1987; BRADRICK *et al.*, 1989; OWNBY *et al.*, 1997).

Outro peptídeo presente no veneno de abelhas é a apamina. Consiste de apenas 18 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 2kDa, sendo o menor peptídeo neurotóxico conhecido. A apamina não é lítica, mas exerce influência sobre as membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico. Em contraste à melitina, a apamina possui um modo de ação altamente específico. (HABERMANN, 1972).

A apamina, semelhante a muitas neurotoxinas de serpentes, se liga no tecido nervoso com grande afinidade aos canais de  $K^+$  ( $Ca^{+2}$ -dependente) (DOTIMAS, HIDER, 1987). Estudos com apamina injetadas intracerebrovascular e intraperitonal em ratos demonstraram efeitos similares, produzindo não somente sinais de envenenamento, como tremor e ataxia, mas também efeitos hemorrágicos nos pulmões (LALLEMENT *et al.*, 1995).

O peptídeo degranulador de mastócitos é constituído de 22 resíduos de aminoácidos, assemelhando-se estruturalmente à apamina. Por outro lado, apresenta duas pontes dissulfídicas, pontes que lhe diferenciam em relação à melitina. Como a melitina é um forte hemolisante e libera serotonina de trombócitos, o peptídeo desgranulador de mastócitos é inativo nesses casos (HABERMANN, 1972).

## 1.6 EFEITOS CLÍNICOS DO VENENO DE ABELHA

A composição dos venenos totais é formada por toxinas e enzimas, as quais através da sua ação sinérgica e aditiva, exercem efeitos em quase todas as células ou tecidos (GUTIERREZ, LOMONTE, 1989).

As manifestações clínicas resultantes de contatos com himenópteros (abelhas, vespas e formigas) são de natureza alérgica, que podem ser desencadeadas por apenas uma única ferroadada, ou de natureza sistêmica, que podem incluir hipotensão, taquicardia, náuseas, sudorese e hipotermia (FRANÇA, 1994).

A reação local a uma ferroadada de abelha consiste em eritema, urticária e angioedema, causando dor e prurido. Se o indivíduo for alérgico, pode apresentar coceiras, coriza e dores de cabeça, mas dependendo da gravidade e do grau de alergenicidade, pode desenvolver um choque anafilático (SHEEHY, 2002)

Fatores que têm contribuído para aumentar o número de ocorrências com esses insetos são a importação de linhagens de abelhas da África, com características mais agressivas e a crescente ocupação urbana (DE MELLO *et al.*, 2003).

A gravidade do acidente causado pelas abelhas africanizadas (AA) se dá, dentre outros motivos, devido ao grande número de abelhas envolvidas no ataque. Pode-se esperar um número maior de reações tóxicas devido a múltiplas ferroadadas, e à

associação às reações alérgicas. Vale ressaltar que é a dose acumulativa de várias picadas que contribui para a morbidade e mortalidade associadas aos incidentes com as abelhas africanizadas, e não à composição do veneno ou o volume de picada individual (AZEVEDO *et al.*, 2006).

As reações sistêmicas se dão devido à grande quantidade de veneno injetado durante um ataque massivo de AA. Sinais e sintomas iniciais incluem edema difuso, inflamação da pele, dor de cabeça, fraqueza, fadiga e tontura (SHEEHY, 2002). Quando o indivíduo é ferroadado por mais de 50 abelhas, geralmente observa-se náusea, vômito e diarreia (SCHUMACHER; EGEN, 1995).

Essas reações causadas por ferroadas de abelhas são mediadas por imunoglobulinas IgE específicas para os constituintes imunológicos destas peçonhas a indivíduos sensíveis. Os sintomas, que podem surgir numa escala de tempo que varia de minutos a algumas horas após a ferroadada, são os seguintes: urticária, angioedema, broncoespasmo, choque anafilático, hipotensão e até mesmo perda de consciência (BRASIL, 2001).

Em indivíduos que levam múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas, geralmente é detectada hemólise intensa, acompanhada por insuficiência renal, causada pela ação da apamina, melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> sobre a membrana eritrocitária. Esses indivíduos também podem evoluir rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal agudas. Nos casos letais, podem ainda apresentar necrose tubular aguda, com presença de cilindros de hemo e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais (BARRAVIERA, 1994).

Múltiplas ferroadas desenvolvem alterações nos músculos estriados esqueléticos, os quais apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação. Alguns indivíduos apresentam lesão subendocárdica com presença de necrose muscular cardíaca. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento (BARRAVIERA, 1994.). Ferreira *et al* (1995) demonstraram que após a inoculação de peçonha de abelha em ratos Wistar, ocorreu lesão necrotizante cardíaca aguda, similar ao infarto humano.

Uma das complicações comuns nos acidentes com abelhas africanizadas é a hipotensão, que pode ser explicada pelo efeito vasoativo (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) da histamina, leucotrienos e outros mediadores químicos. Esses mediadores são liberados endogenamente pela ação da histamina, do peptídeo degranulador de mastócitos, da melitina e da fosfolipase A<sub>2</sub>, que compõem o veneno. Alguns experimentos realizados em coelhos, gatos e camundongos relataram hipotensão logo após a inoculação do veneno de *Apis mellifera*. A melitina produz queda na pressão arterial, é cardiotóxica e representa o principal componente do veneno. A fosfolipase A<sub>2</sub>, o segundo principal componente, também tem mostrado hipotensão acentuada em gatos e cães (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Dentre os efeitos tóxicos do veneno destacam-se a ação vasoativa da histamina e dos leucotrienos, que, liberados endogenamente, podem contribuir para o estabelecimento do edema e da congestão encontrados em vários órgãos. Esses achados foram descritos também em acidentes por múltiplas ferroadas, mostrando a possibilidade de sobreposição dos efeitos tóxicos com a insuficiência renal aguda. Sendo assim, em todos esses achados, verifica-se o papel da hemodinâmica renal e a sua fundamental importância para a manutenção do funcionamento do rim em pacientes acidentados por ferroadas de *Apis mellifera* (PENTEADO *et al.*, 2003).

Além de todas as manifestações citadas, o veneno das abelhas também pode ocasionar uma série de outras reações sistêmicas imediatas ou tardias. Ataques massivos de dezenas a centenas de ferroadas têm elevada toxicidade, podendo ocasionar a falência de diversos órgãos, tais como: coração, fígado e rim. As reações tóxicas incluem trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, hipercalemia, hiperglicemia e hipertensão (GRISOTTO *et al.*, 2006). A melitina é capaz de agregar plaquetas humanas de uma maneira dose-dependente, ativando a cascata do ácido araquidônico. Dessa forma, pode ser destacada a trombocitopenia, que promove hemorragias e acarreta complicações hemodinâmicas (TERRA *et al.*, 2006).

Para o tratamento de emergência às vítimas de ferroadas de abelhas, tem se empregado antihistamínicos, corticosteróides, broncodilatadores, vasodilatadores, bicarbonato, manitol e ventilação mecânica (MULLER *et al.*, 1991; BARRAVIERA, 1994). No entanto, mesmo após esse tratamento, tem se observado a morte de pacientes, entre 22 e 71 horas após o ataque maciço de picadas, alguns inclusive apresentando necrose hepatocelular, necrose tubular aguda, necrose focal subendocardial e coagulação intravascular disseminada (FRANÇA *et al.*, 1994).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A rica biodiversidade brasileira constitui uma grande oportunidade para a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico. Estima-se que 10 a 20% de todas as espécies conhecidas no mundo estão presentes no Brasil (cerca de dois milhões) e que muitas dessas espécies são encontradas exclusivamente no Brasil (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

Vários estudos objetivam descobrir a ação de toxinas animais e o mecanismo envolvido nos efeitos locais e sistêmicos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos busca, na biodiversidade, ferramentas farmacológicas e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos (PEIXOTO, 2003).

Desta forma, é cada vez maior a procura por moléculas ativas que possam atuar produzindo hormônios, ou ainda, potencializando o sistema renal e vascular (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

As técnicas de revolução biotecnológica, como por exemplo, genômica, genômica funcional, proteômica, metabolômica e citômica têm fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. O sufixo "ômica" indica uma série de novas disciplinas e procedimentos que visam à identificação funcional e/ou estrutural de tecidos, células, padrões de expressão gênicos e características metabólicas. Essas estratégias encontram uma variedade de aplicações por meio do monitoramento de indicadores celulares ou bioquímicos, tais como a transcrição de

um gene específico ou variação da expressão/função de uma determinada proteína, envolvendo desde as etapas de identificação de alterações fisiológicas e/ou metabólicas induzidas pelo estado de doença até a avaliação dos efeitos dos fármacos sobre o organismo humano (BHOGAL, BALLS, 2008).

Apesar de promissoras, essas tecnologias apresentam algumas limitações, como: a necessidade de métodos capazes de interpretar e correlacionar de forma otimizada a imensa quantidade de informações geradas e a aplicação dos dados biológicos de forma racional e efetiva no planejamento de fármacos (BHOGAL, BALLS, 2008).

Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e a biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área da saúde, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna (GUIDO *et al.*, 2010).

Logo, de acordo com todo o exposto, faz-se necessário um estudo no sentido de entender os complexos efeitos do veneno de *Apis mellifera* sobre os sistemas vasculares e renais, com o intuito de investigar os mecanismos celulares e moleculares, pois, tais informações podem contribuir para melhorar e embasar os protocolos terapêuticos, bem como para bioprospecção de possíveis aplicações dos componentes desse veneno como uma ferramenta farmacológica. Então, diante desses fatos, confirma-se a relevância do estudo da ação do veneno de abelha em tecidos e órgãos isolados.

# OBJETIVOS

*A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da abelha *Apis mellifera* e de suas principais frações fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e Melitina, contribuindo para a melhoria de possíveis protocolos terapêuticos, com o propósito de contribuir na bioprospecção de novas ferramentas farmacológicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ⇒ Estudar os efeitos induzidos pelo veneno total e as frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera* em um sistema de perfusão de rim isolado de rato;
- ⇒ Observar as alterações histológicas em rins tratados com veneno total e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera*;
- ⇒ Estudar as alterações induzidas pelo veneno total de *Apis mellifera* em cultura de células de epitélio de túbulos renais de cães (células MDCK);
- ⇒ Estudar possíveis alterações vasculares em anel de aorta de rato utilizando veneno total, frações isoladas de PLA<sub>2</sub> e Melitina, e as frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) complexadas do veneno de *Apis mellifera*;
- ⇒ Verificar possíveis alterações histológicas em anéis de aorta expostos ao veneno de *Apis mellifera*.

# MATERIAL E MÉTODOS

*Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.*

*William Hazlitt*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará foram usados nos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec<sup>®</sup>) e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, eles eram submetidos a jejum de 8 a 12 horas com água “*ad libitum*”.

#### 3.2 VENENO, FÁRMACOS, REAGENTES E SAIS UTILIZADOS

O veneno total e as frações PLA<sub>2</sub> e melitina da abelha da espécie *Apis mellifera* foi cedido pelo professor Marcos Hikari Toyama, da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). A caracterização química do veneno também foi realizada pelo grupo do professor Marcos Hikari Toyama (Anexo 1). Os fármacos, reagentes e sais utilizados para a realização dos experimentos foram obtidos da empresa Sigma<sup>®</sup> (Saint Louis, MO - EUA).

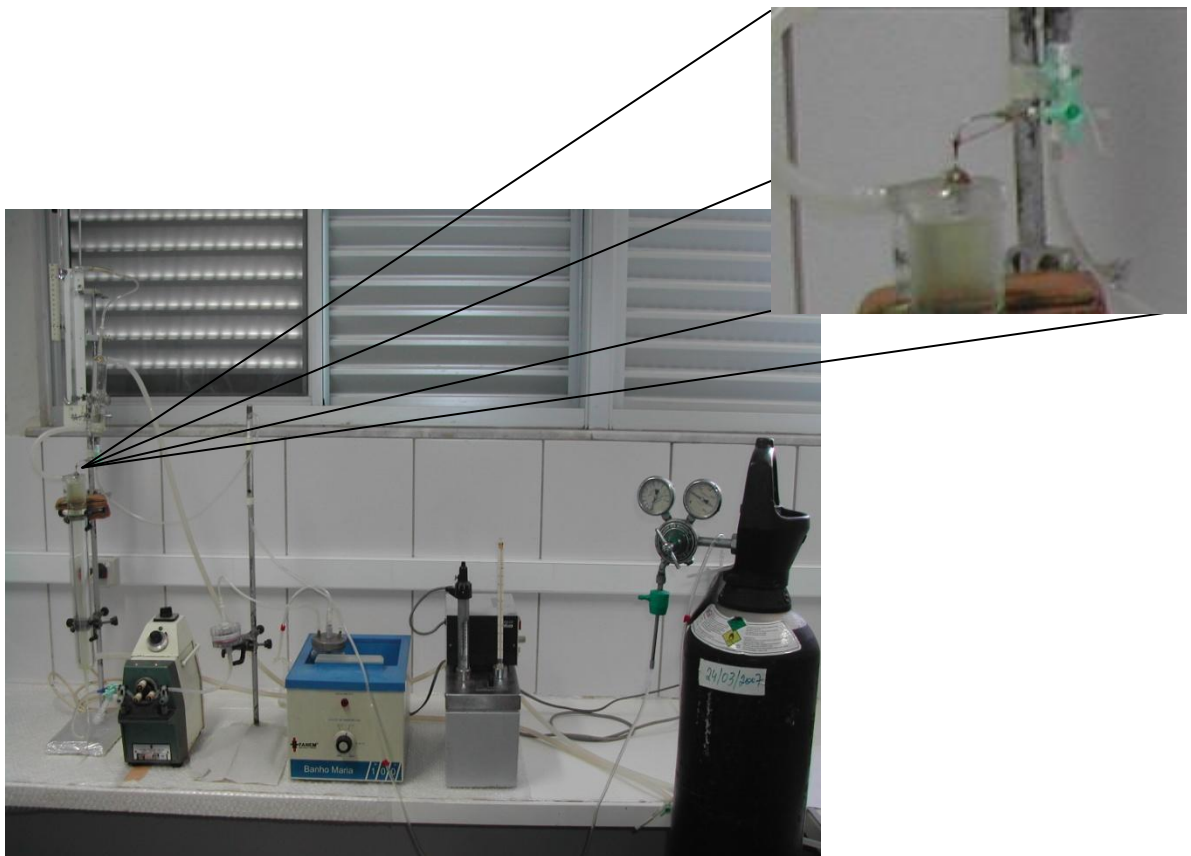
#### 3.3 CÉLULAS MDCK

As células MDCK foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo - USP) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Professora Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes.

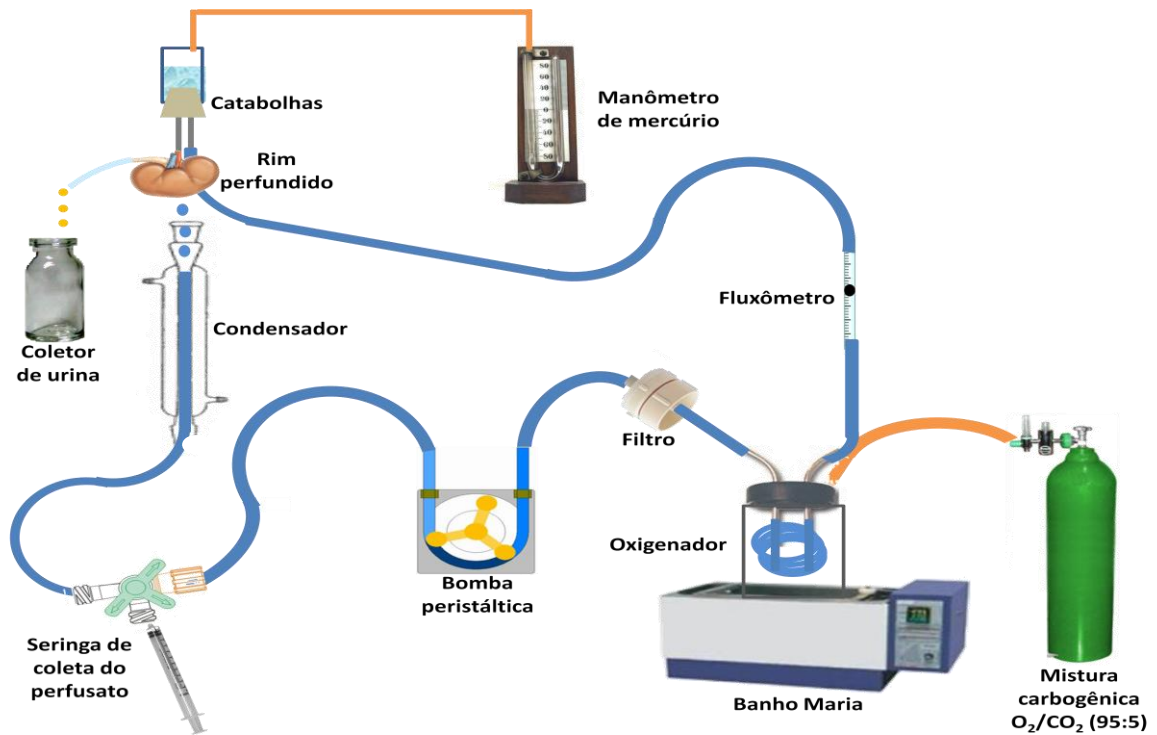
### 3.4 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

#### 3.4.1 SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL

Com a finalidade de se verificar os efeitos do veneno de *Apis mellifera* em parâmetros renais, realizou-se experimentos com rins de isolados ratos. A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a presente técnica de perfusão. O sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) e é composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à mesma temperatura (37 °C). O sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (em menor quantidade) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação adaptada ao próprio sistema, como demonstrado nas figuras 6 e 7.



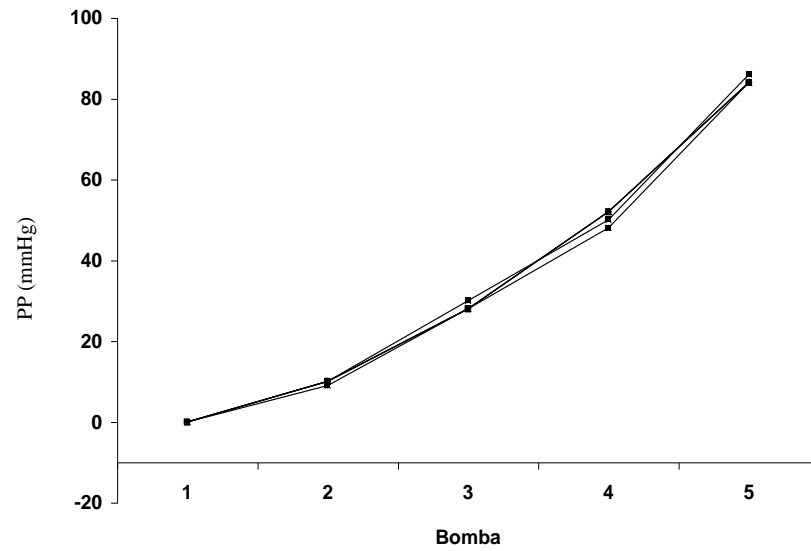
**Figura 06.** Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.



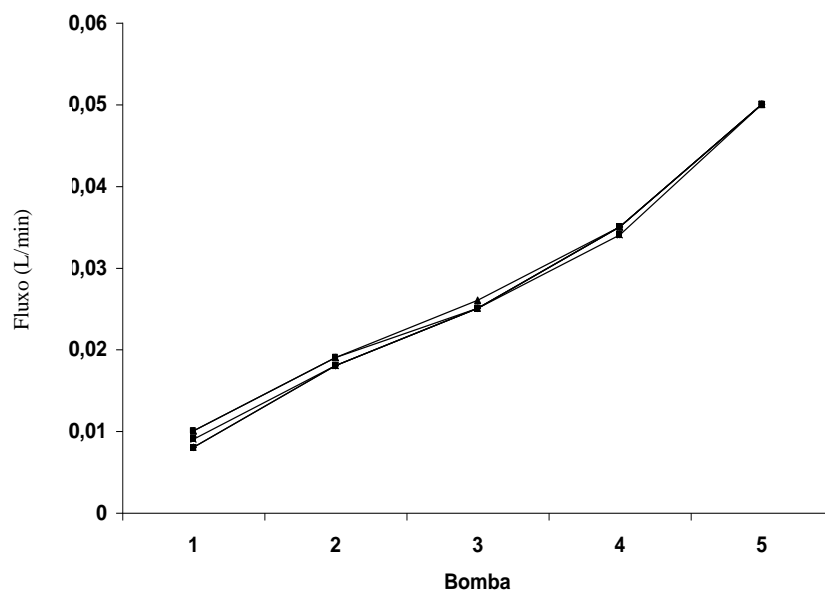
**Figura 07.** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado (SOUSA, 2010).

### 3.4.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

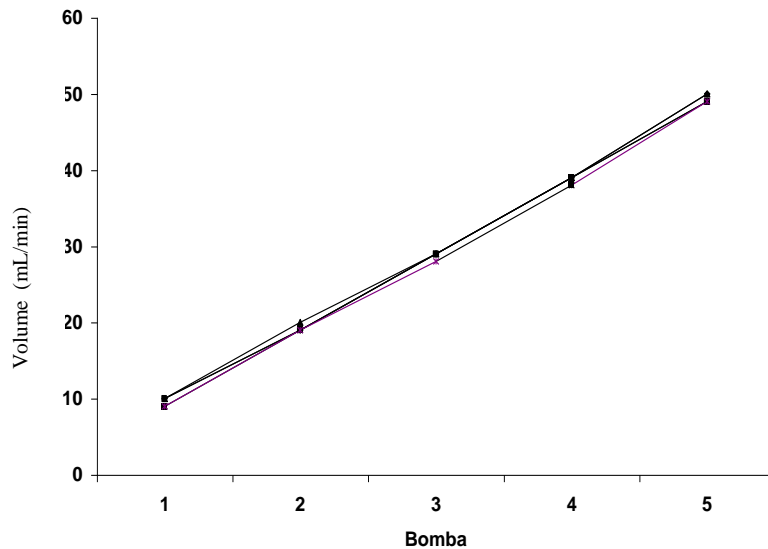
O sistema foi calibrado antes do início de cada experimento. Foram avaliados, em cada uma das bombas (de 1 a 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 8, 9 e 10.



**Figura 08.** Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 09.** Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 10.** Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

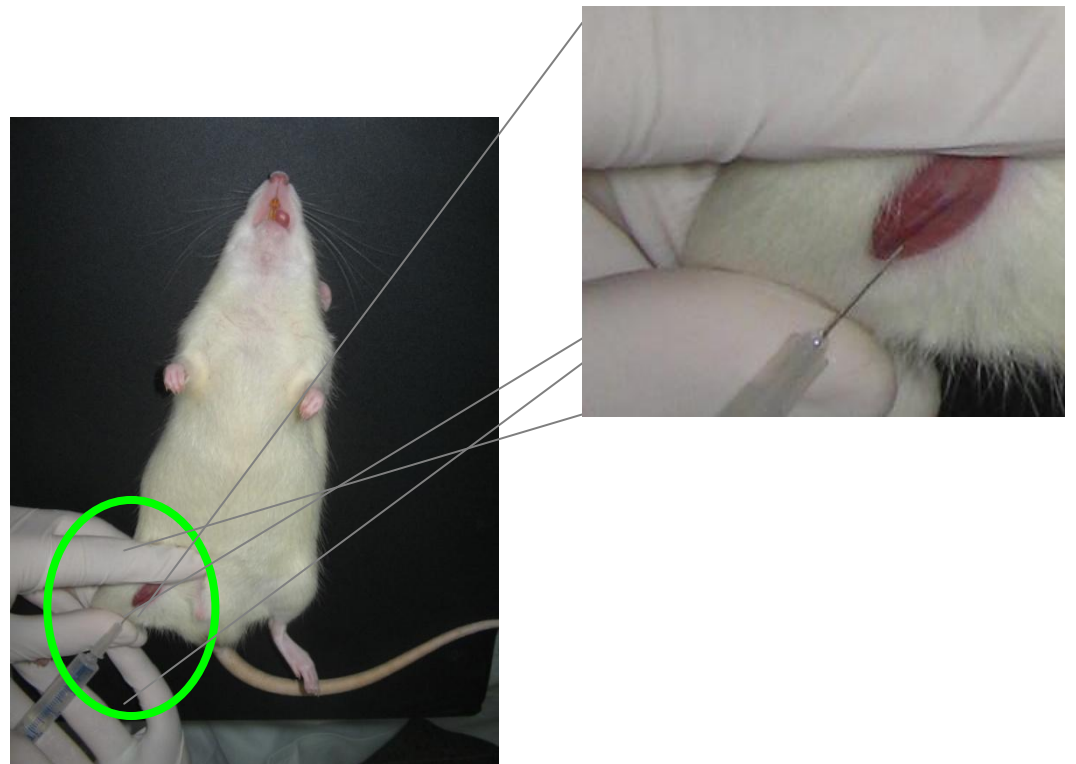
### 3.4.3 SOLUÇÃO PERFUSORA

A solução perfusora utilizada foi a de Krebs-Henseleit, contendo albumina bovina a 6% (p/v) e dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (HANSON, BALLARD, 1968).

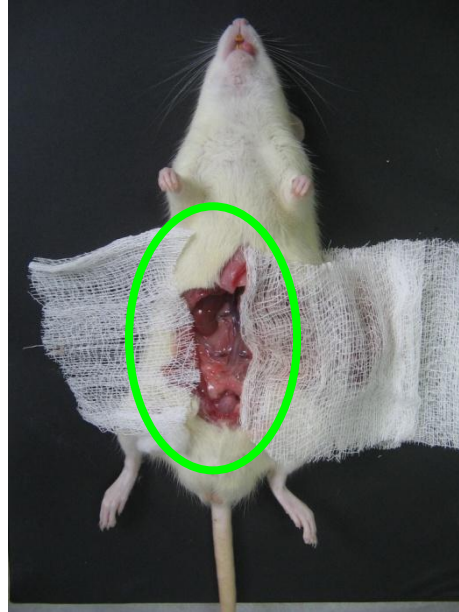
### 3.4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais (n=6) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e o manitol (300mg/3mL – independentemente do peso) foi administrado (figura 11), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter (BOWMAN, 1970).

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatómicas abdominais (figura 12).

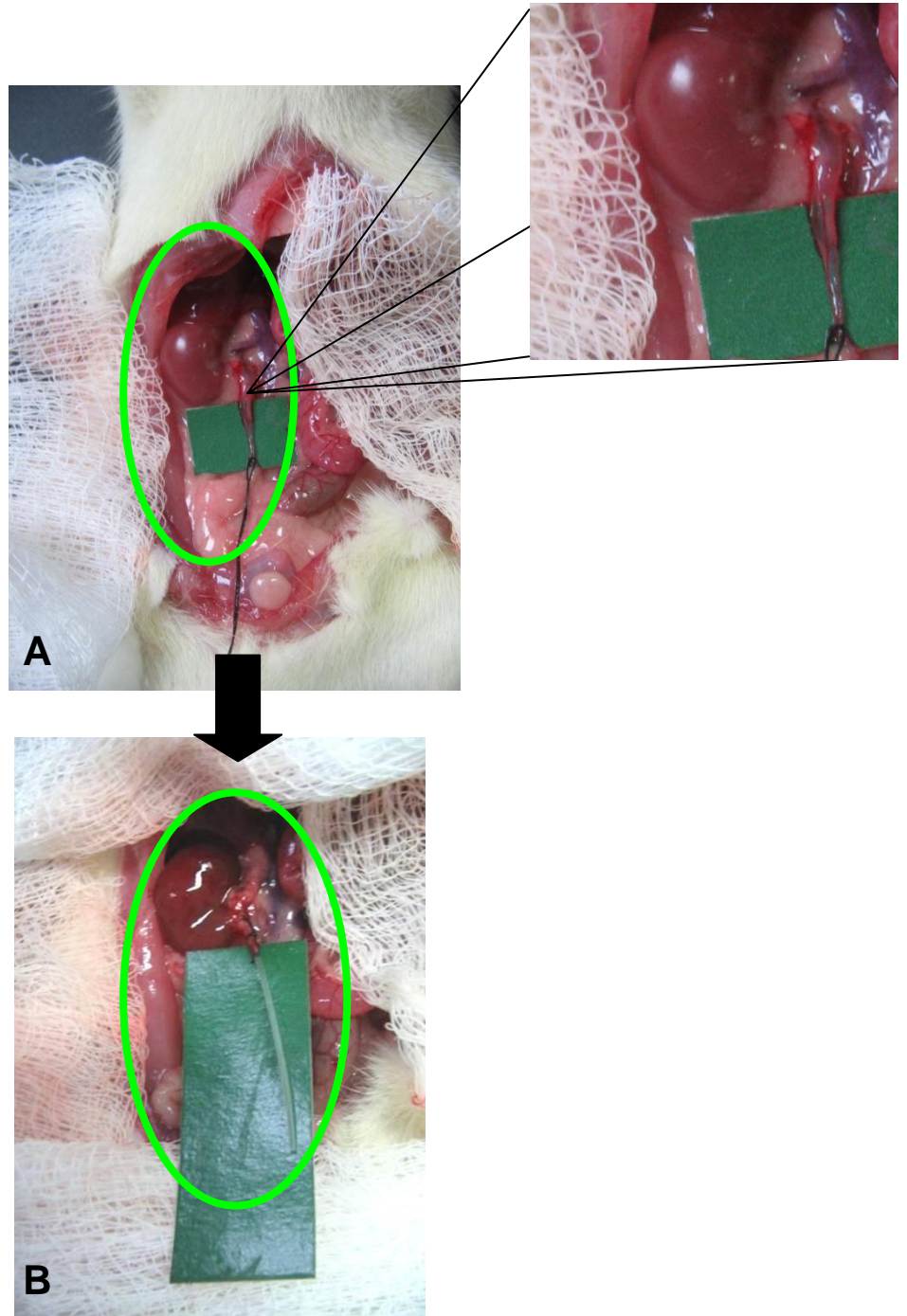


**Figura 11.** Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado.

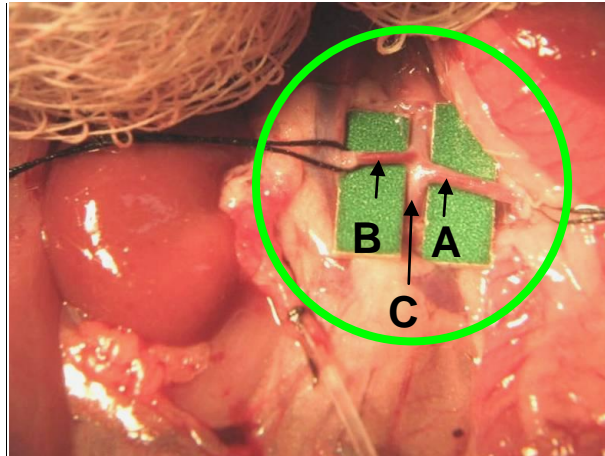


**Figura 12.** Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.

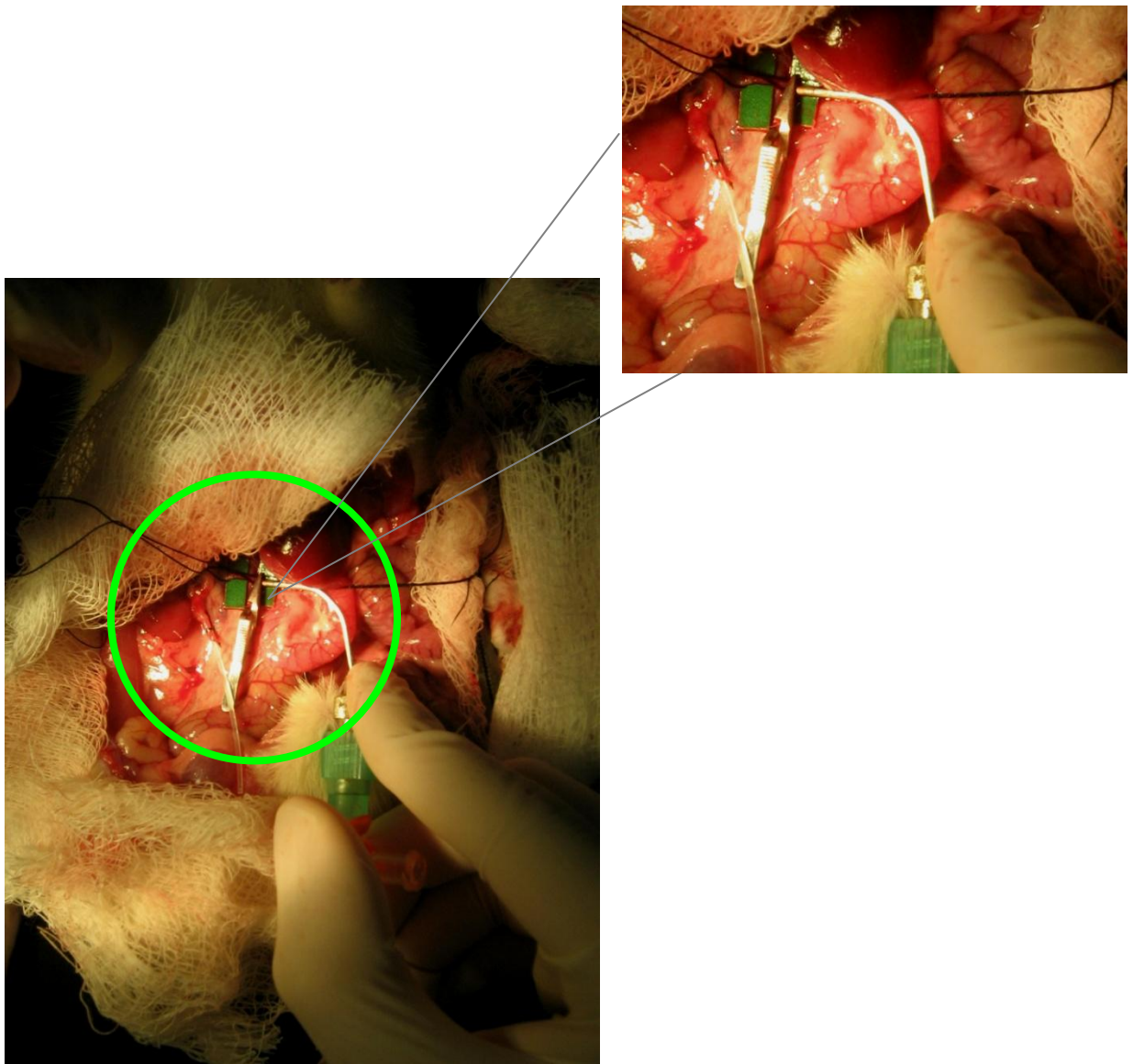
Com uma lupa (aumento de 7 vezes) o ureter foi identificado, dissecado e canulado – tubo de polietileno PE-30 (figura 13), bem como a artéria mesentérica superior, artéria renal (Figura 14) e a glândula supra-renal identificados. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Outra cânula metálica foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi realizada a fixação da cânula (figura 15).



**Figura 13.** Identificação (A) e canulação (B) do ureter.

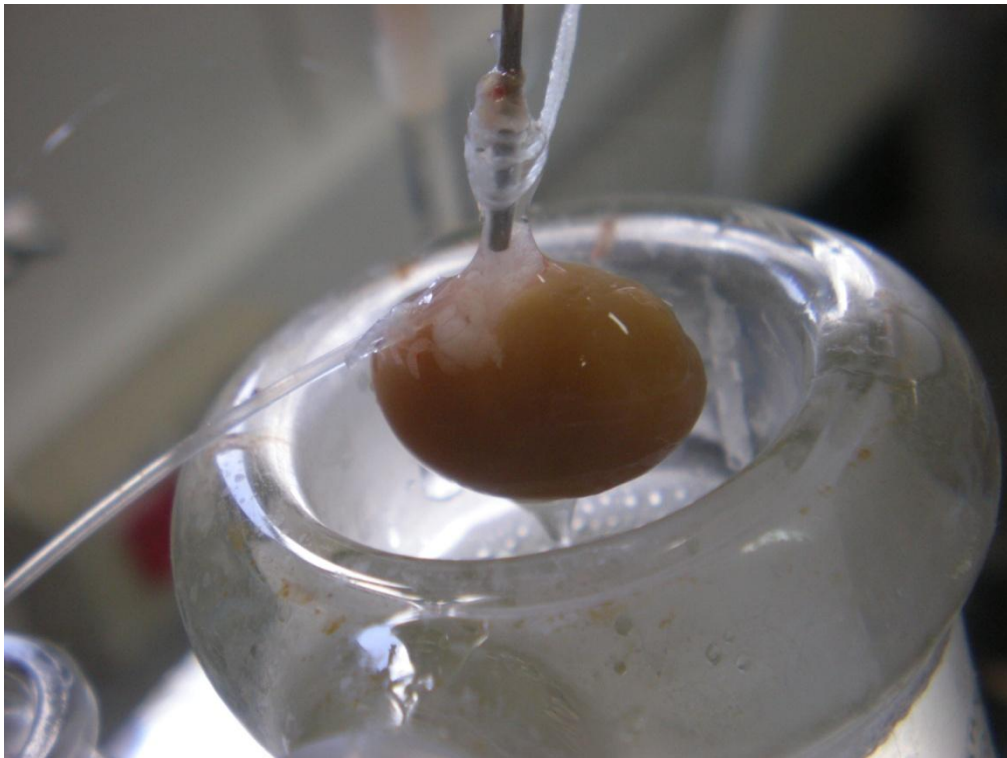


**Figura 14.** Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C).



**Figura 15.** Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim *in vivo*, evitando qualquer isquemia do órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 16).



**Figura 16.** Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.

### 3.4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.4.5.1 VENENO TOTAL

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30min iniciais foram utilizados como controle interno para os experimentos com as três diferentes concentrações do veneno total de *Apis mellifera* e com uma concentração da associação das frações complexada (PLA<sub>2</sub> +melitina) do veneno de *Apis mellifera*. As concentrações utilizadas do veneno total foram 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL e da fração (PLA<sub>2</sub> +melitina) foi 1,8µg/mL. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min. Amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos. Depois, as amostras foram congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, fundamentais para os cálculos dos parâmetros da função renal (Fonteles *et al*, 1983).

#### 3.4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas determinações de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem 744 - Bayer<sup>®</sup> diagnóstica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foi medida utilizando um osmômetro (WESCOR<sup>®</sup>, modelo Vapro<sup>®</sup> 5520). Esses parâmetros foram determinados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

### 3.5.7 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS RENAIIS AVALIADOS

A figura 17 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais utilizados para obtenção dos valores e dos gráficos utilizados na tese. Os cálculos demonstrados foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

<b>FU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo urinário</b></li> <li>• <math>FU = (\text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo}) / 10</math></li> </ul>
<b>PP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PP (mmHg) = Pressão de perfusão</b></li> <li>• Leitura em manômetro</li> </ul>
<b>RFG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular</b></li> <li>• <math>RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in} \times FU)</math> sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato</li> </ul>
<b>FPR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo de perfusão renal</b></li> <li>• Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)</li> </ul>
<b>RVR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RVR (mmHg.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal</b></li> <li>• <math>RVR = PP (\text{mmHg}) / FPR</math></li> </ul>
<b>FNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado</b></li> <li>• <math>FNa^+ = RFG \times PNa^+</math> (<math>PNa^+</math> = Concentração de sódio no perfusato)</li> </ul>
<b>ENa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado</b></li> <li>• <math>ENa^+ = FU \times UNa^+</math> (<math>UNa^+</math> = Concentração de sódio na urina)</li> </ul>
<b>TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado</b></li> <li>• <math>TNa^+ = FNa^+ - ENa^+</math></li> </ul>
<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte de sódio transportado</b></li> <li>• <math>\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>FK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio filtrado</b></li> <li>• <math>FK^+ = RFG \times PK^+</math> (<math>PK^+</math> = concentração de potássio no perfusato)</li> </ul>
<b>EK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio excretado</b></li> <li>• <math>EK^+ = FU \times UK^+</math> (<math>UK^+</math> = Concentração de potássio na urina)</li> </ul>
<b>TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio transportado</b></li> <li>• <math>TK^+ = FK^+ - EK^+</math></li> </ul>
<b>%TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TK<sup>+</sup> = Percentual de transporte de potássio</b></li> <li>• <math>\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>FCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto filtrado</b></li> <li>• <math>FCl^- = RFG \times PCl^-</math> (<math>PCl^-</math> = Concentração de cloreto no perfusato)</li> </ul>
<b>ECl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ECl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto excretado</b></li> <li>• <math>ECl^- = FU \times UCl^-</math> (<math>UCl^-</math> = Concentração de cloreto na urina)</li> </ul>
<b>TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto transportado</b></li> <li>• <math>TCl^- = FCl^- - ECl^-</math></li> </ul>
<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte de cloreto</b></li> <li>• <math>\%TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>

**Figura 17.** Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados (em azul).

Cada um desses parâmetros permite fazer inferência a diversos efeitos. A PP indica se a substância ou a toxina na qual se está testando é capaz de modificar as forças que regem a perfusão renal. Em relação à RVR, esse parâmetro possibilita investigar se as alterações na PP estão relacionadas à contração ou relaxamento dos vasos que irrigam o tecido renal. O FU permite observar se o tecido renal está produzindo um volume de urina maior ou menor. Em relação ao RFG, verifica-se se a depuração ou *clearance* aumentou, através de marcadores como a inulina. O percentual de transporte tubular (total e proximal) permite com que se possam observar possíveis alterações tubulares em relação ao aumento ou redução da reabsorção/excreção de eletrólitos, verificando a manutenção da função tubular. O *clearance* osmótico, por sua vez, verifica como o rim está depurando substâncias osmoticamente ativas e se essas estão sendo eliminadas em maior ou menor quantidade na urina. Todos esses parâmetros da fisiologia renal, associados à análise histológica, permitem verificar possíveis mecanismos de manutenção/alteração da função renal.

#### **3.4.8 ESTUDO HISTOLÓGICO RENAL**

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal pegando córtex e medula do rim perfundido (direito) e não perfundido (esquerdo) sendo colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de microscopia de luz (NIKON®). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido – controle externo). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus® CKX 41® com câmera digital acoplada (Evolt E3030® Olympus®).

### **3.5 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS**

#### **3.5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS MDCK (MADIN-DARBY CANINE KIDNEY)**

Para investigar se o veneno estudado possui citotoxicidade em células de túbulos renais, utilizaram-se culturas de células epiteliais de túbulos de cães (Madin-Darby Canine Kidney - MDCK). Essas células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm<sup>2</sup>), utilizando o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup>) a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

#### **3.5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

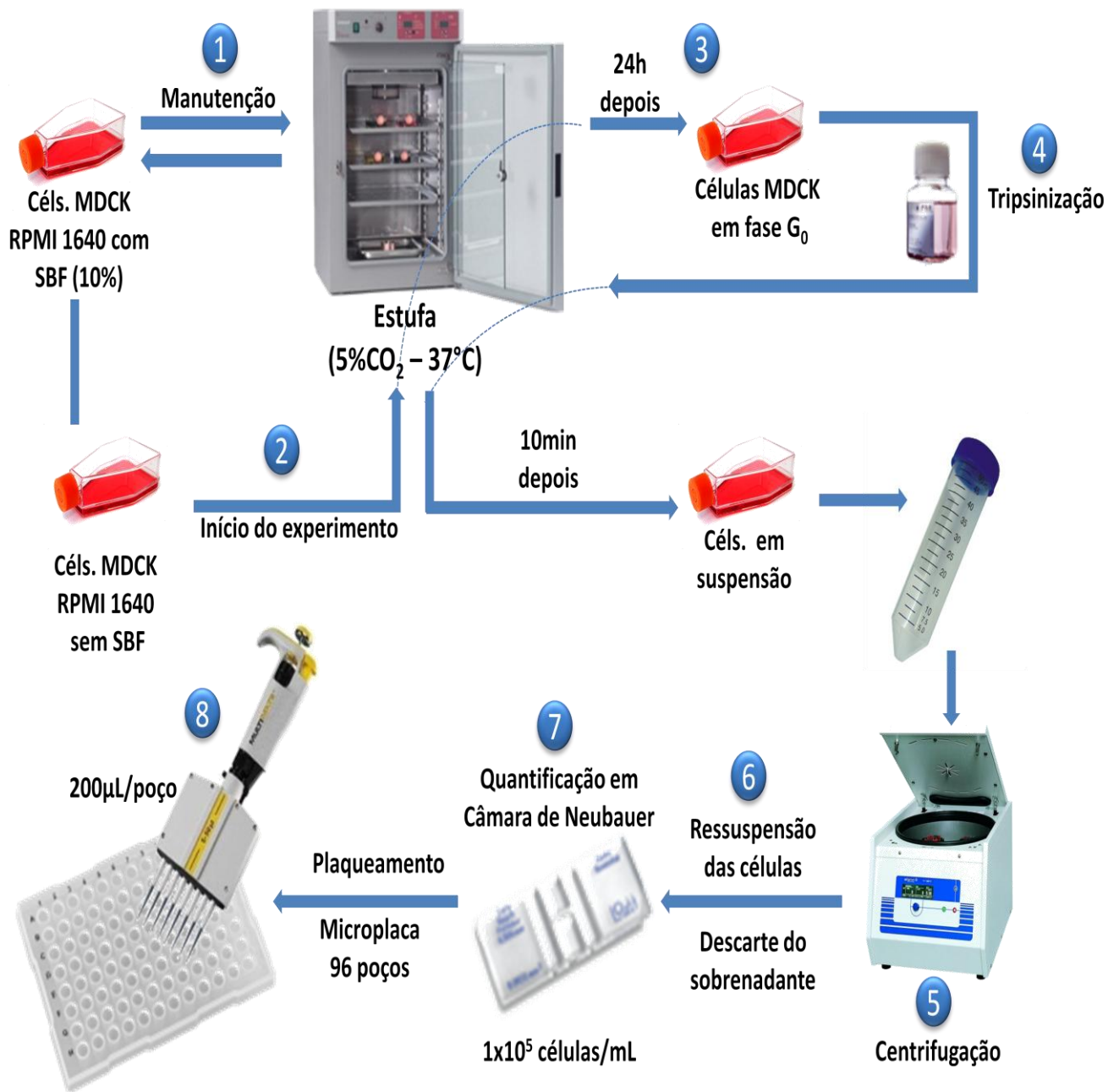
O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan (produto de cor púrpura insolúvel em água), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar o percentual de células vivas. Assim, pode-se verificar a capacidade do veneno de destruir as células MDCK, uma vez que células viáveis são capazes de formar o formazan. A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra.

Para realização do ensaio com sal de tetrazolium (MTT), as células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal (SBF) por 24 horas para sincronizá-las na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) e ficaram em contato com esse reagente por aproximadamente 10min em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Depois de suspensas em meio de cultura com 10% de SFB, realizou-se

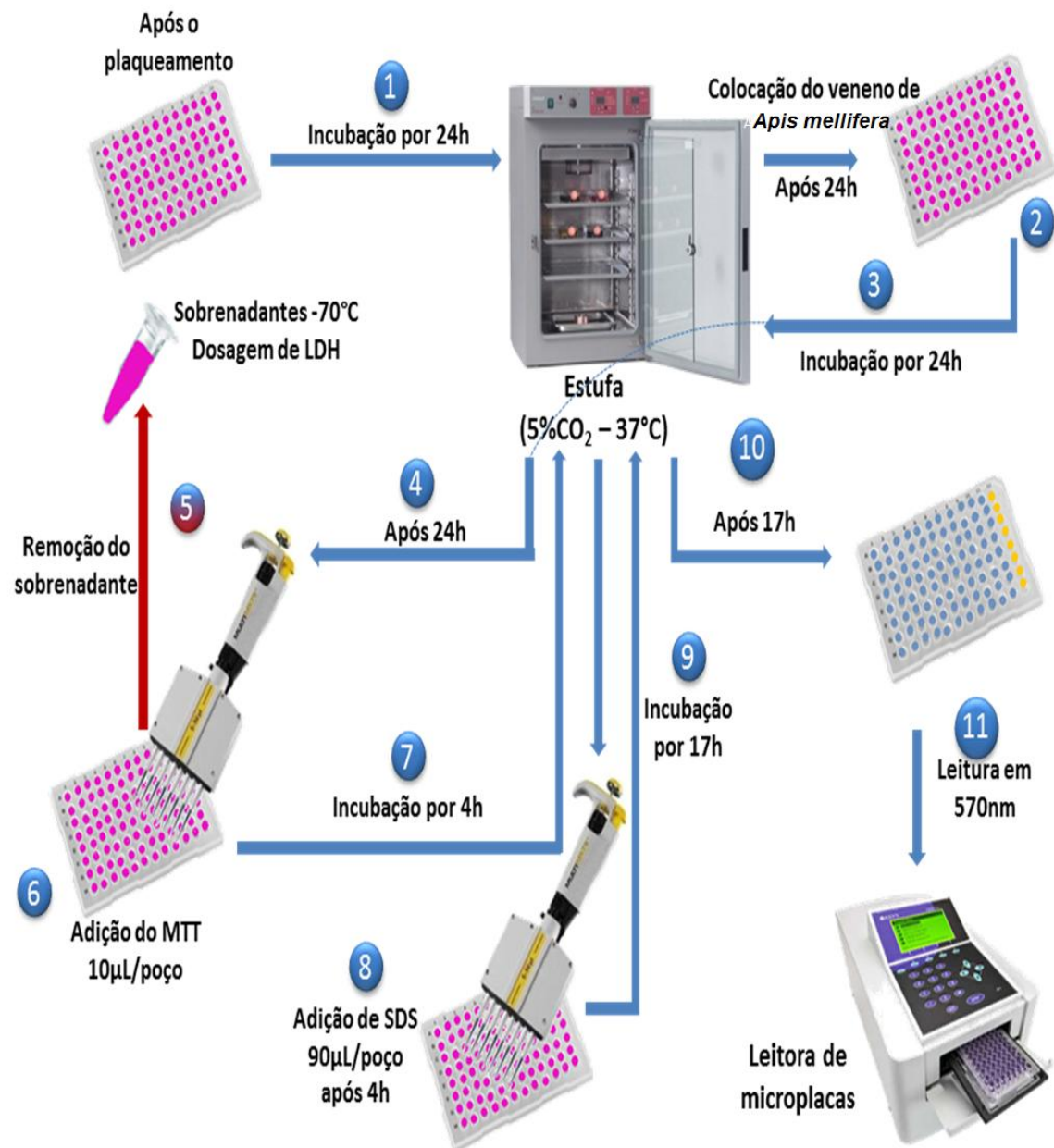
centrifugação por 5min a 4.000rpm, re-suspensão e quantificação das células em câmara de Neubauer, utilizando coloração com azul de trypan. Conhecido o número de células por mL, as mesmas foram transferidas (200µL -  $1 \times 10^5$  células/mL) para placas de 96 poços (figura 18). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionadas diferentes concentrações do veneno total de *Apis mellifera* – 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/ML. Como controle negativo, foi utilizado tampão fosfato (PBS - *phosphate buffer solution*) estéril com pH 7,4.

Após nova incubação por 24 horas nas mesmas condições descritas, removeu-se 100µL do sobrenadante do meio de cultura, que foi armazenado em freezer a -70°C para determinação da enzima lactato desidrogenase (LDH), segundo indicações do fabricante (Labtest® - equipamento semi-automático Labquest®) - quando aumentada a atividade da enzima LDH, há indícios de extravasamento e lesão da membrana celular, permitindo verificar o tipo de dano que a célula sofreu (dano direto e/ou apoptose). Ao volume restante ainda presente na placa, adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. Novamente as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C por mais 17 horas. Após esse último procedimento, realizou-se a leitura da absorbância de cada poço da placa com comprimento de onda de 570nm em uma leitora de microplacas ASYS® Expert Plus® (figura 19).

Foram realizados os experimentos de forma independente (n=3) e em triplicada para cada concentração. Controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas nesse grupo e nos demais grupos tratados com veneno (MOSMANN, 1983). Fotomicrografias foram realizadas para documentar os aspectos morfológicos celulares dos grupos estudados através do microscópio Olympus® CKX 41® com câmera digital acoplada (Evolt E330® Olympus®).



**Figura 18.** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney). (SOUSA, 2010).



**Figura 19.** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney). (SOUSA, 2010).

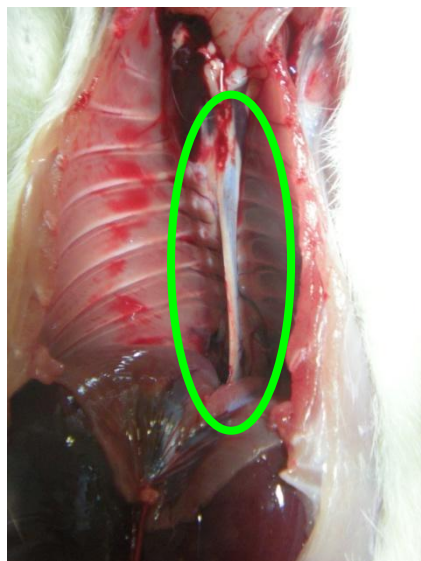
### 3.6 ANEL DE AORTA

#### 3.6.1 TÉCNICA CIRÚRGICA

A avaliação dos efeitos vasculares do veneno de *Apis mellifera* em vasos de condutância foi realizada através dos ensaios em anel de aorta isolado de ratos Wistar machos (n=4).

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Depois da realização de incisão no tórax do animal foram extirpados os pulmões e o coração para visualização do segmento torácico da aorta (figura 20).

Após o procedimento cirúrgico, o segmento da aorta torácica foi removido (figura 21) e cortado transversalmente em anéis cilíndricos (1mm x 5mm) que foram acoplados em peças triangulares de aço ligadas a um fio (figura 22). As preparações foram suspensas horizontalmente em cubas de volume de 5mL para órgãos isolados contendo solução de Tyrode modificada (figura 23) com a seguinte composição, em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5 (pH 7,4 - mantida a 37°C). Os tecidos foram mantidos em uma tensão basal de 1g na cuba com a solução devidamente aerada.



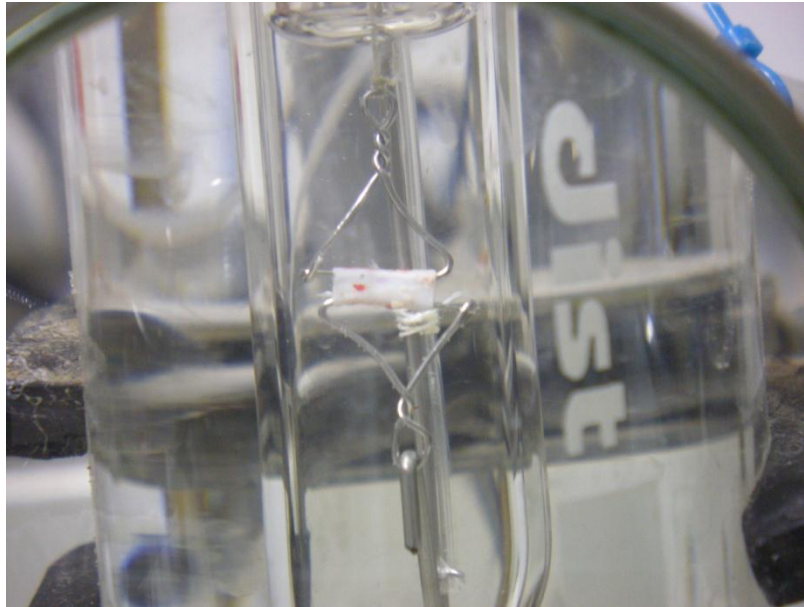
**Figura 20.** Visualização do segmento torácico da aorta no animal dissecado.



**Figura 21.** Segmento da aorta torácica isolada e devidamente dissecado.

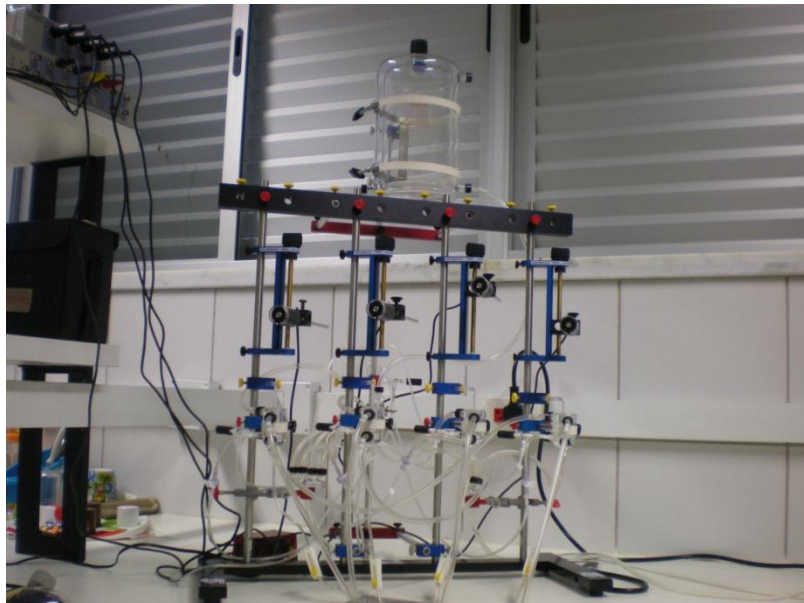


**Figura 22.** Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares.

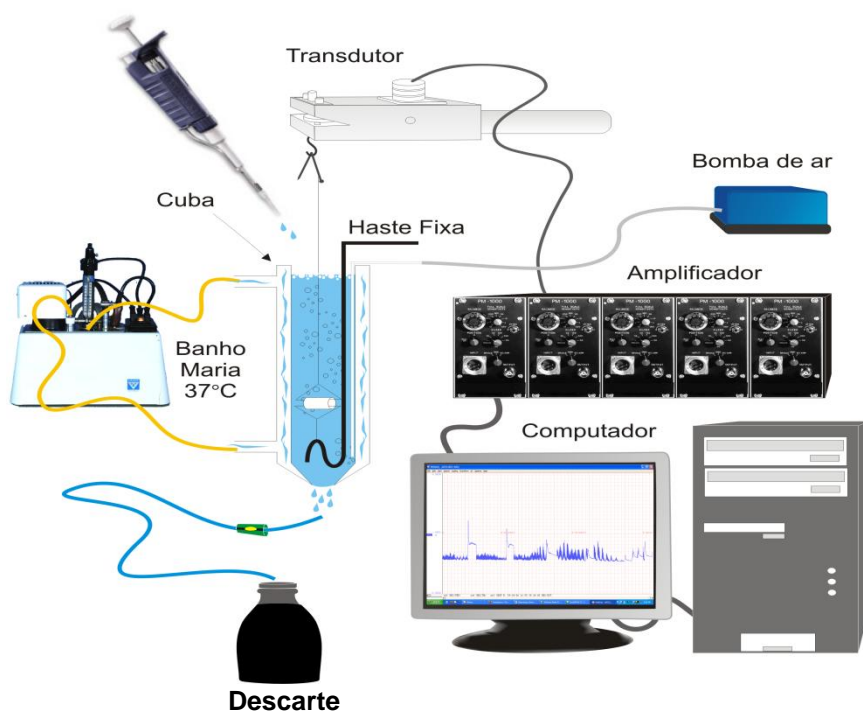


**Figura 23.** Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada.

As contrações foram registradas isometricamente por transdutores de força, conectados a um sistema de aquisição de dados (Dataq® PM-1000, EUA, figuras 24 e 25).



**Figura 24.** Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato. *Fonte:* Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso



**Figura 25.** Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso. (Figura elaborada por David Matthews Jucá).

Após período de estabilização do tecido no sistema (aproximadamente 60 minutos), contrações foram induzidas por adição de potássio 60mM em três curvas adotadas como controle (teste da viabilidade do tecido).

### 3.6.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram realizados protocolos experimentais, nos quais foram utilizadas várias concentrações (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu$ g/mL), do veneno total e das frações da *Apis mellifera*.

Esses protocolos são descritos a seguir:

### **3.6.2.1 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL**

O efeito na tensão basal do músculo liso vascular com o endotélio intacto foi avaliado através da exposição dos anéis as concentrações crescentes do veneno.

### **3.6.2.2 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* EM MEIO LIVRE DE CÁLCIO NA PRESENÇA DE EGTA (ETILENO GLICOL TETRACÉTICO)**

Buscando analisar a influência do cálcio intracelular no efeito do veneno sobre os anéis de aorta, foram realizados ensaios em meio ausente de cálcio. Após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, em meio com solução de Tyrode normal, as preparações foram lavadas três vezes por três minutos com solução de Tyrode ausente de  $\text{CaCl}_2$  e adicionado o agente quelante EGTA (1mM), garantindo a total retirada de cálcio do meio extracelular, seguida da adição do veneno.

### **3.6.2.3 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* EM MEIO COM FENTOLAMINA, VERAPAMIL, LOSARTAN E INIBIDOR DE FOSFOLIPASE C (U-73122)**

Para verificar um provável mecanismo mediador da ação vascular do veneno, foram realizados ensaios em anéis de aorta com a administração de um bloqueador operador de voltagem (Verapamil  $10\mu\text{M}$ ; n=05), um antagonista  $\alpha$ -adrenérgico (Fentolamina  $5\mu\text{M}$ ; n=05), um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II (Losartan  $100\mu\text{M}$ ; n=05), um inibidor de fosfolipase C (U-73122  $10\mu\text{M}$ ; n=05), após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, seguida da adição do veneno.

### 3.6.2.3 EFEITO DAS FRAÇÕES PLA<sub>2</sub> E MELITINA ISOLADOS, E EFEITO DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + MELITINA) DO VENENO DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL

O efeito na tensão basal do músculo liso vascular com o endotélio intacto foi avaliado através da exposição dos anéis as concentrações crescentes das frações isoladas de PLA<sub>2</sub> e melitina e da fração complexada (PLA<sub>2</sub>+melitina) do veneno na tentativa de elucidar qual era o peptídeo responsável pelo efeito.

### 3.7.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DOS ANEIS DE AORTA

Ao final de cada experimento, os segmentos de anel de aorta submetidos aos protocolos experimentais descritos anteriormente foram colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Após isso, os anéis de aorta foram desidratados e diafanizados e, em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (NIKON). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolt E330<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média ± erro padrão da média e a diferenças estatísticas entre os grupos estudados verificada pelo teste *t* de *Student* (pareado e não pareado) e análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ou Holm-Sidak (múltipla comparação entre os grupos). A análise estatística foi realizada utilizando-se os *softwares* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>, Sigma Plot 11<sup>®</sup> e GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

### **3.9 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os procedimentos adotados para a realização dos protocolos experimentais descritos estão de acordo com os preceitos éticos adotados pela comunidade científica nacional e internacional. Os protocolos experimentais também foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará com o número 01/2012, conforme anexo 2.

# RESULTADOS

*Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas.*

*Confúcio*

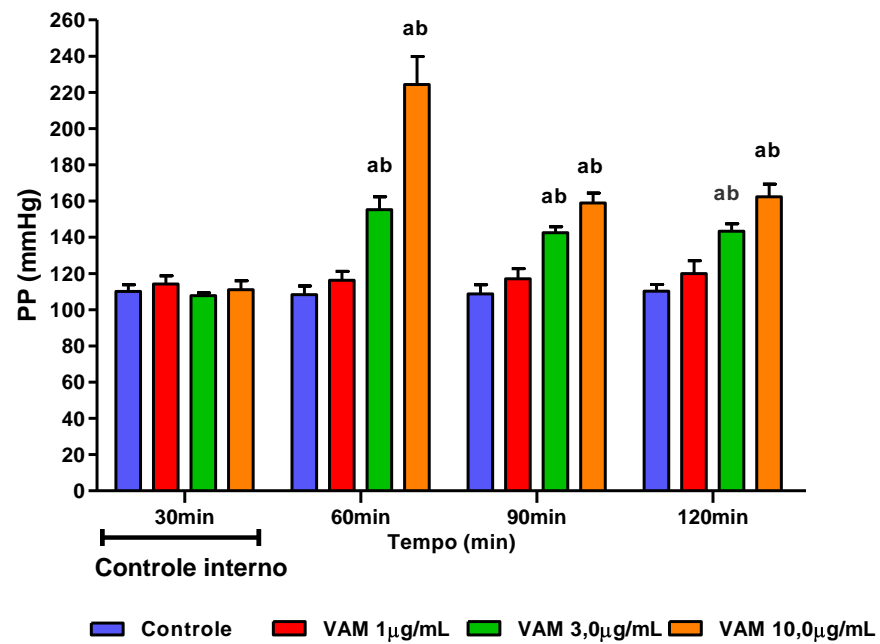
## 4 RESULTADOS

### 4.1 PERFUSÃO RENAL

#### 4.1.1 PERFUSÃO RENAL DO VENENO TOTAL

De acordo com os experimentos realizados com o veneno total de *Apis mellifera*, nas técnicas de perfusão, verificou-se que a função renal é afetada em todos os parâmetros estudados em duas das concentrações testadas.

Em termos de pressão de perfusão (PP), observou-se que houve aumento significativo desse parâmetro aos 60min com as concentrações de 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL. Na concentração de 3,0 $\mu$ g/mL, a PP foi mantida significativamente aos 90 e 120min. Na maior concentração (10,0 $\mu$ g/mL) ocorreu uma redução aos 90 e 120min, no entanto, sendo significativo em relação aos controles (figura 26 e tabela 1).



**Figura 26.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) na pressão de perfusão renal (PP). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

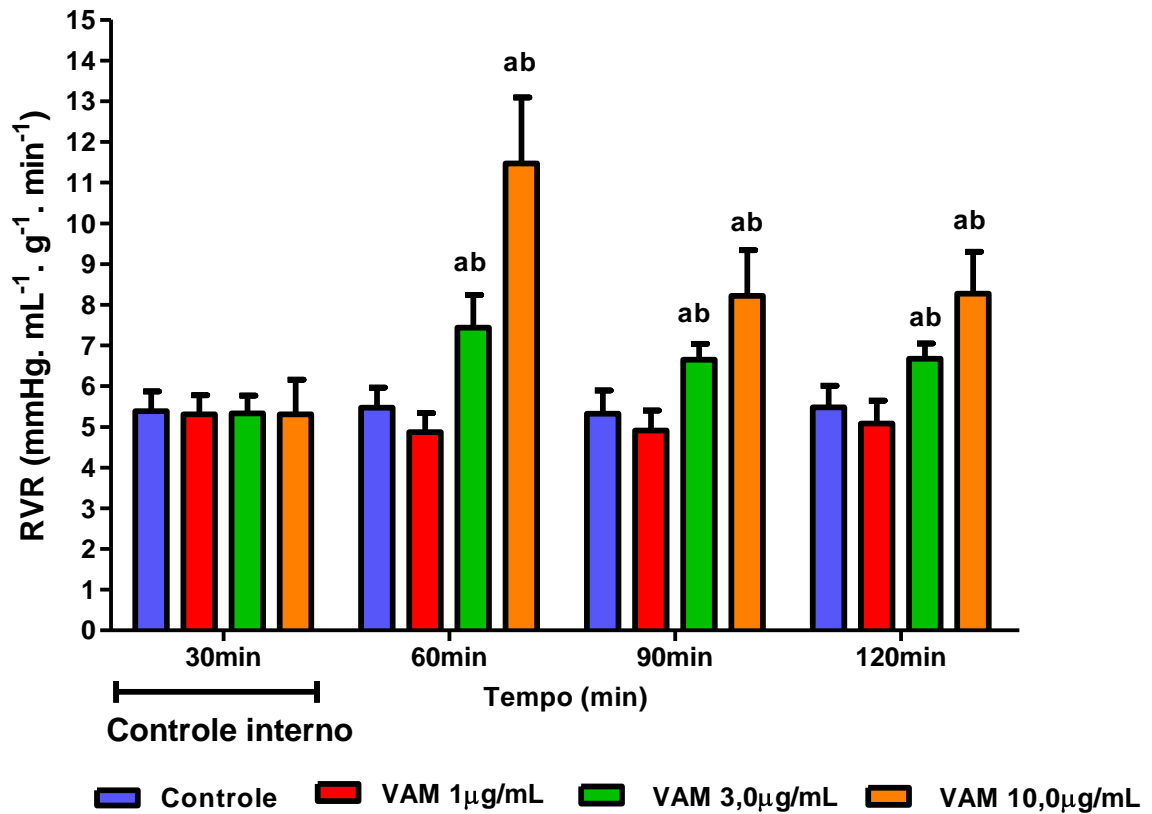
**Tabela 1.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	110,10	3,68	114,20	4,53	107,80	1,40	111,00	4,98
60	108,27	4,88	116,20	5,01	155,20 <sup>ab</sup>	7,20	224,3 <sup>ab</sup>	15,45
90	108,69	5,08	117,10	5,56	142,50 <sup>ab</sup>	3,30	158,68 <sup>ab</sup>	5,51
120	110,28	3,69	120,00	6,99	143,30 <sup>ab</sup>	4,20	162,3 <sup>ab</sup>	5,51

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

A resistência vascular renal (RVR) também se mostrou aumentada a partir dos 60min quando o rim foi perfundido com VAM nas concentrações de 3µg/mL e 10µg/mL. O VAM, na concentração de 10,0µg/mL promoveu uma redução desse parâmetro aos 90 e 120min, no entanto, essa redução ainda foi significativa quando comparada aos controles internos e externos.

Essas alterações podem ser observadas na figura 27 e na tabela 2, apresentadas a seguir.



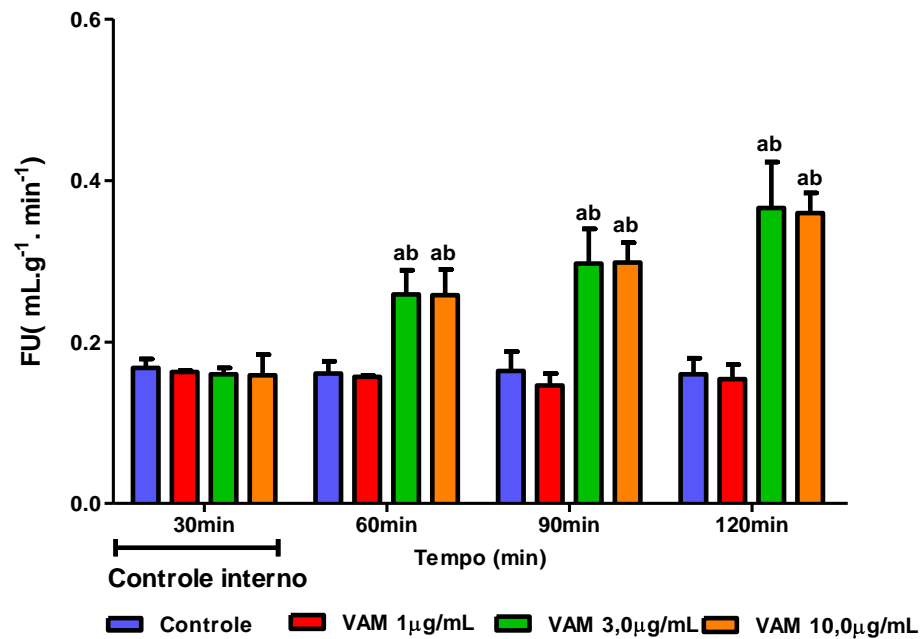
**Figura 27.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) na resistência vascular renal (RVR). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$  – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 2.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	5,31	0,47	5,33	0,44	5,81	0,85
60	5,47	0,49	4,87	0,47	7,44 <sup>ab</sup>	0,80	11,47 <sup>ab</sup>	1,62
90	5,32	0,57	4,91	0,49	6,65 <sup>ab</sup>	0,39	8,22 <sup>ab</sup>	1,12
120	5,48	0,53	5,08	0,56	6,67 <sup>ab</sup>	0,38	8,27 <sup>ab</sup>	1,03

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

O fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), também foram alterados pelo VAM. O FU foi aumentado aos 60min e manteve-se até 120min nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL, esse aumento permaneceu significativo tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle (figura 28 e tabela 3). Em comparação ao FU que aos 60min verificou-se um aumento significativo em relação aos controles interno e externo o RFG acompanhou esse crescimento apenas aos 90min, valendo ressaltar que essa crescente foi verificada apenas nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL, sendo esse perfil de alteração permanecido até aos 120min para o RFG (figura 29 e tabela 4).

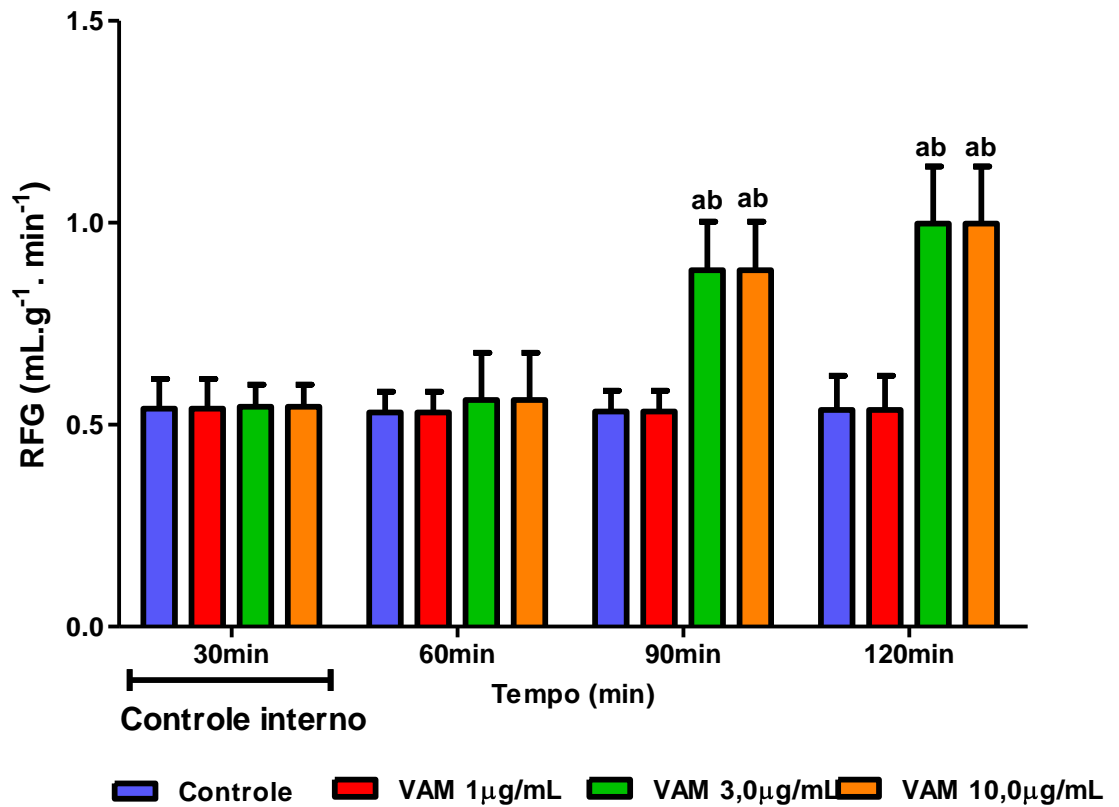


**Figura 28.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no fluxo urinário (FU). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>30</b>	0,168	0,011	0,1430	0,0013	0,1569	0,008	0,1488	0,0254
<b>60</b>	0,161	0,015	0,1570	0,0014	0,2590 <sup>ab</sup>	0,030	0,1800 <sup>ab</sup>	0,0320
<b>90</b>	0,164	0,024	0,1460	0,0151	0,2970 <sup>ab</sup>	0,0430	0,2985 <sup>ab</sup>	0,0244
<b>120</b>	0,160	0,020	0,1540	0,0180	0,3760 <sup>ab</sup>	0,0570	0,3598 <sup>ab</sup>	0,2485

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 29.** Efeitos do veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

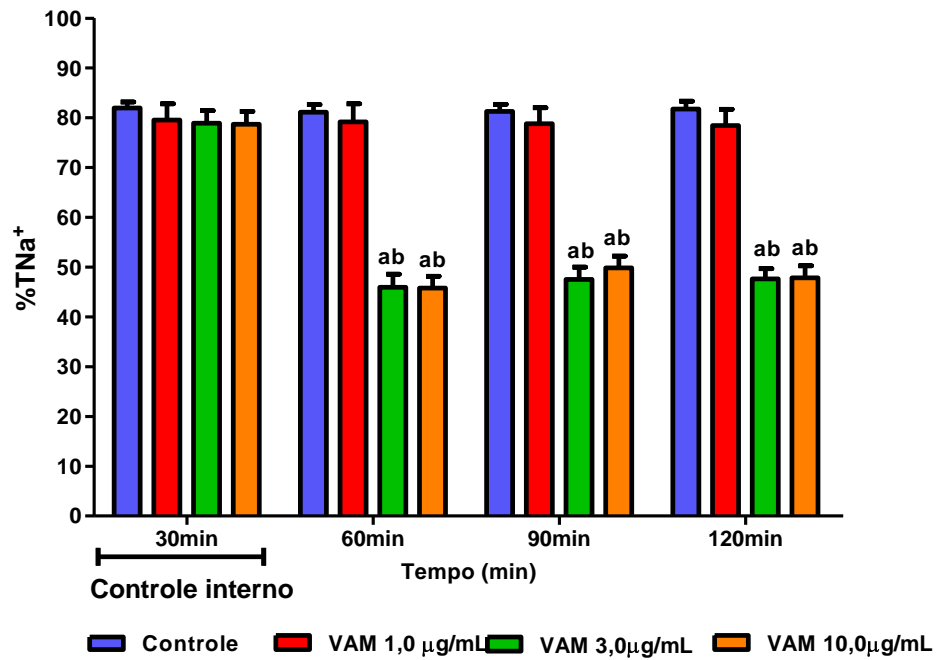
**Tabela 4.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,5359	0,1093	0,599	0,0540	0,5678	0,1370
60	0,707	0,051	0,5180	0,0633	0,561	0,1170	0,5872	0,1049
90	0,633	0,051	0,5580	0,0557	0,673 <sup>ab</sup>	0,1600	0,5358 <sup>ab</sup>	0,0574
120	0,697	0,084	0,6264	0,0940	0,794 <sup>ab</sup>	0,1810	0,5618 <sup>ab</sup>	0,5551

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Os transportes de eletrólitos também foram bastante alterados. O veneno nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL levou a alterações nos tempos de 60, 90 e 120min nos rins perfundido com o VAM.

O percentual de transporte de Na<sup>+</sup> (%TNa<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> (%TK<sup>+</sup>) e Cl<sup>-</sup> (%TCl<sup>-</sup>), nas concentrações de 3µg/mL e 10,0µg/mL reduziu significativamente esse parâmetro nos três tempos (60, 90 e 120min) em relação aos controles interno e externo, assim como demonstrado nas figuras 30, 31 e 32, além das tabelas 5, 6 e 7.

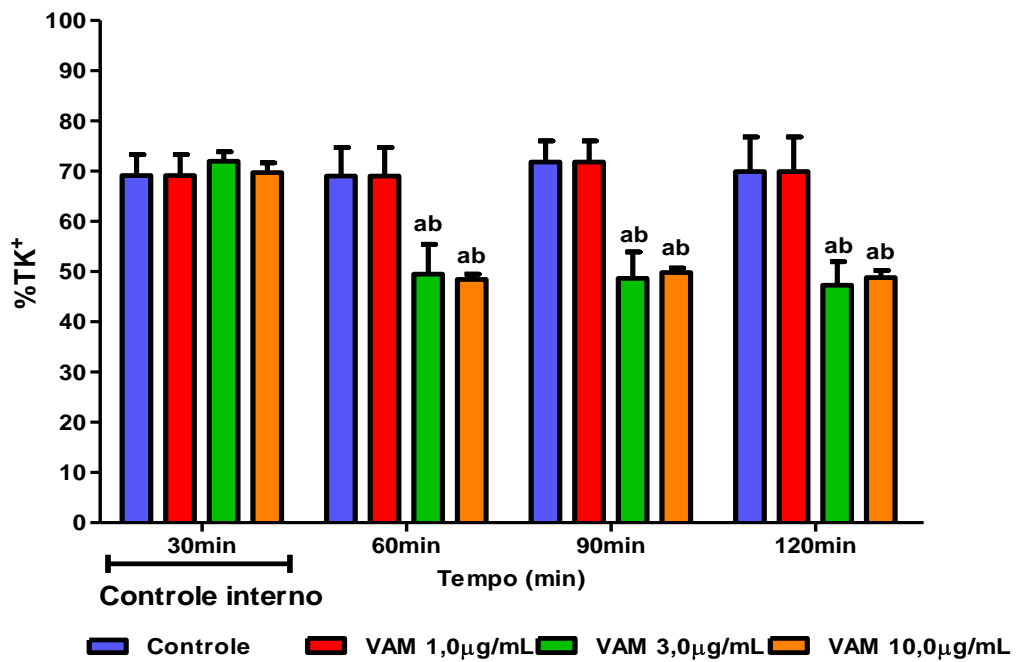


**Figura 30.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (1; 3,0 e 10,0 µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 5.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	79,55	3,28	78,89	2,57	78,71	2,57
60	81,11	1,52	79,15	3,66	45,95 <sup>ab</sup>	2,64	45,77 <sup>ab</sup>	2,39
90	81,26	1,45	78,78	3,22	47,55 <sup>ab</sup>	2,46	49,83 <sup>ab</sup>	2,39
120	81,76	1,56	78,41	3,27	47,62 <sup>ab</sup>	2,09	47,85 <sup>ab</sup>	2,40

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

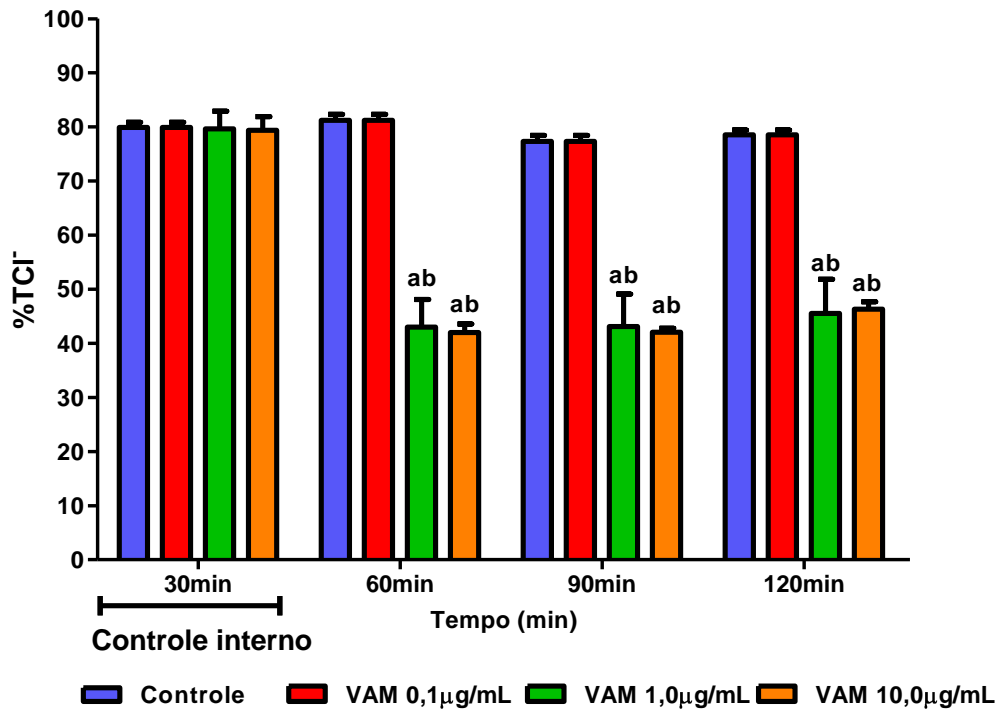


**Figura 31.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 6.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1,0µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>30</b>	69,13	4,14	69,53	4,74	71,95	1,94	69,73	1,94
<b>60</b>	69,04	5,68	69,54	5,18	49,49 <sup>ab</sup>	5,94	48,44 <sup>ab</sup>	1,08
<b>90</b>	71,84	4,21	71,34	4,71	48,65 <sup>ab</sup>	5,28	49,84 <sup>ab</sup>	0,87
<b>120</b>	69,94	6,86	69,24	6,26	47,29 <sup>ab</sup>	4,69	48,82 <sup>ab</sup>	1,42

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 32.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de cloreto (%TCl<sup>-</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 7.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1,0µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	0,98	79,40	0,91	79,63	3,30	79,40	2,53
60	81,25	1,06	81,85	1,96	42,97 <sup>ab</sup>	5,14	41,97 <sup>ab</sup>	1,62
90	77,32	1,12	77,92	1,18	43,12 <sup>ab</sup>	6,01	42,04 <sup>ab</sup>	0,73
120	78,53	0,89	78,13	0,19	45,51 <sup>ab</sup>	6,32	46,30 <sup>ab</sup>	1,40

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

#### 4.1.2 PERFUSÃO RENAL DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + Melitina) DO VENENO DE *Apis mellifera*

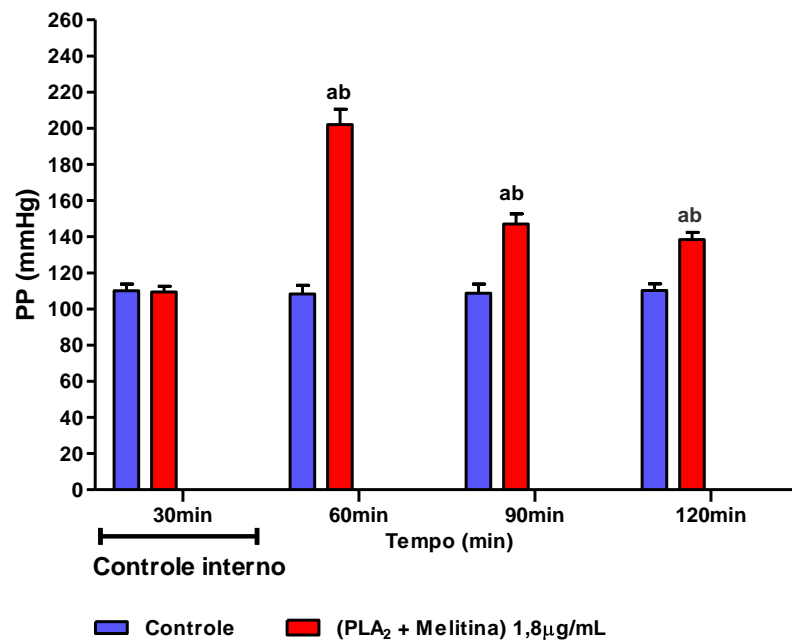
Os experimentos realizados em perfusão renal com o veneno total, nas concentrações de 3 e 10µg/mL do veneno alterou significativamente todos os parâmetros renais.

De acordo com dados na literatura, o complexo da fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina) do veneno de *Apis mellifera*, representa em torno de 60% do veneno total, desta forma, fazendo o cálculo proporcional, 1,8µg/mL do complexo de fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina) representam 3µg/mL do veneno total.

Verificou-se que a função renal é afetada em todos os parâmetros estudados. Em termos de pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR), observou-se que houve aumento significativo desses parâmetros aos 60min, ocorreu uma redução tanto da PP e RVR aos 90 e 120min, no entanto, sendo significativo em relação aos controles interno e externo, conforme figuras 33 e 34 e tabelas 8 e 9.

O fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), também foram alterados pelo complexo de fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina). O FU foi aumentado aos 60min e manteve-se até 120min, esse aumento permaneceu significativo tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle (figura 35 e tabela 10). Em comparação ao FU que aos 60min verificou-se um aumento significativo em relação aos controles, o RFG acompanhou esse crescimento apenas aos 90min, valendo ressaltar que esse perfil de alteração permaneceu até aos 120min para o RFG (figura 36 e tabela 11).

Os transportes de eletrólitos também foram bastante alterados. O percentual de transporte de Na<sup>+</sup> (%TNa<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> (%TK<sup>+</sup>) e Cl<sup>-</sup> (%TCl<sup>-</sup>), na concentração testada reduziu significativamente esse parâmetro nos três tempos (60, 90 e 120min) em relação aos controles interno e externo, assim como demonstrado nas figuras 37, 38 e 39, além das tabelas 12, 13 e 14.

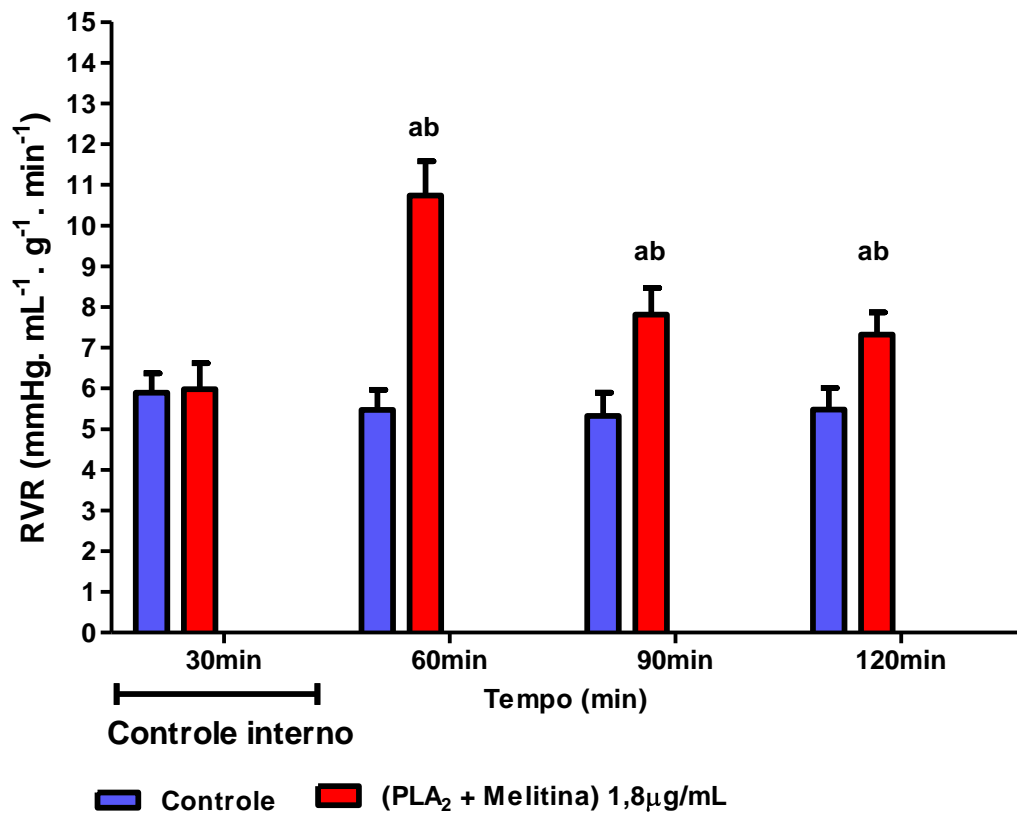


**Figura 33.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na pressão de perfusão renal (PP). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8μg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 8.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	110,10	3,68	5,13	3,68
60	108,27	4,88	7,44 <sup>ab</sup>	5,88 <sup>ab</sup>
90	108,69	5,08	7,65 <sup>ab</sup>	6,65 <sup>ab</sup>
120	110,28	3,69	7,67 <sup>ab</sup>	6,67 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

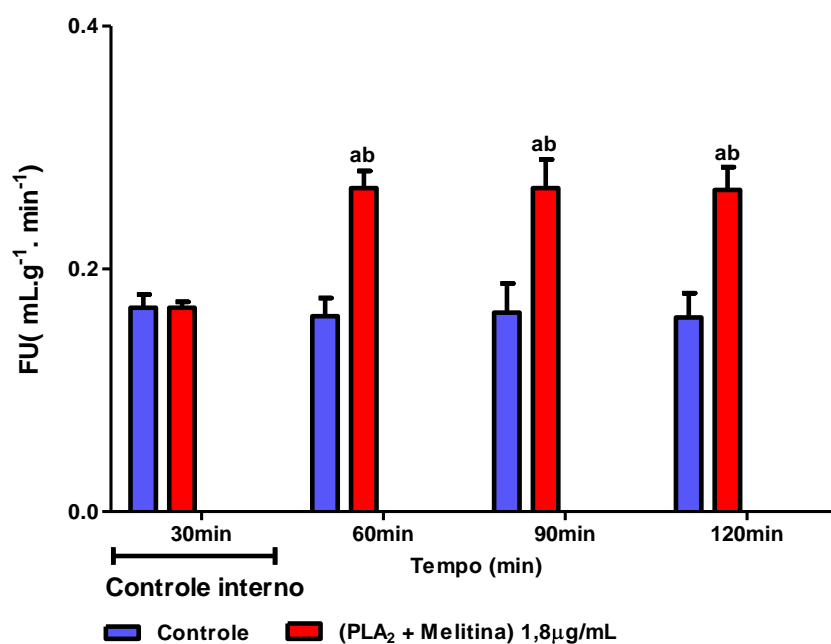


**Figura 34.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na resistência vascular renal (RVR). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 9.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	5,13	0,44
60	5,47	0,49	7,44 <sup>ab</sup>	0,80 <sup>ab</sup>
90	5,32	0,57	7,65 <sup>ab</sup>	0,79 <sup>ab</sup>
120	5,48	0,53	7,67 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

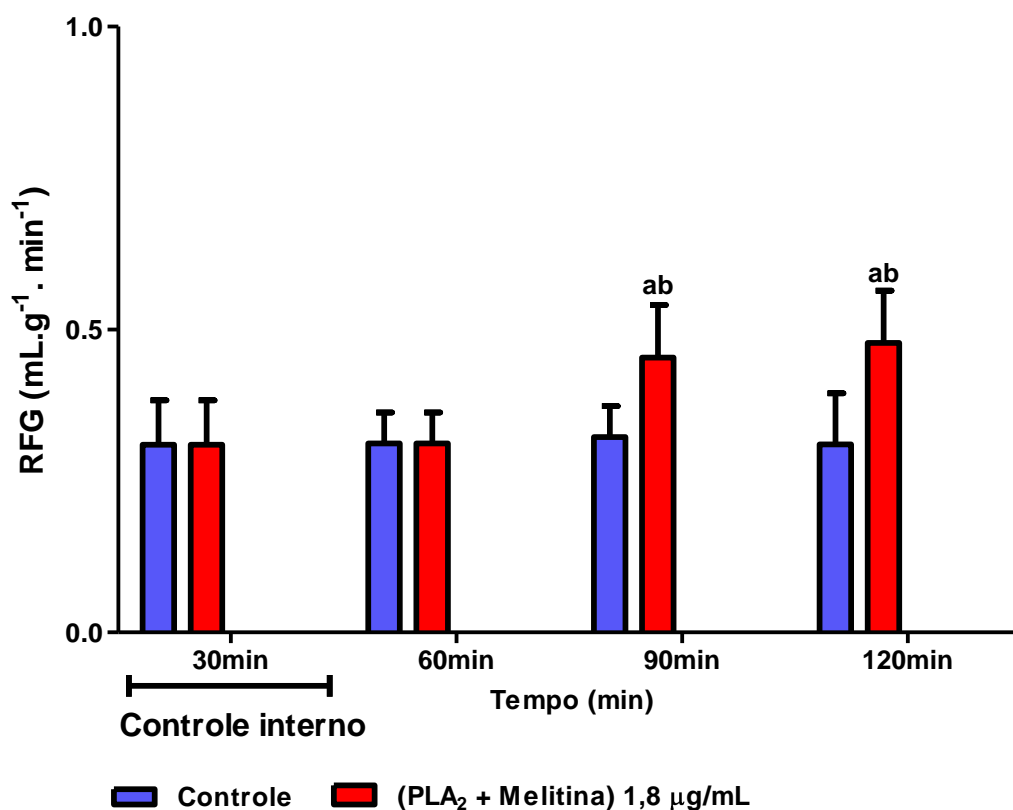


**Figura 35.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* no fluxo urinário (FU). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6 foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 10.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,168	0,011	0,156	0,008
60	0,161	0,015	0,259 <sup>ab</sup>	0,030 <sup>ab</sup>
90	0,164	0,024	0,297 <sup>ab</sup>	0,043 <sup>ab</sup>
120	0,160	0,020	0,376 <sup>ab</sup>	0,057 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

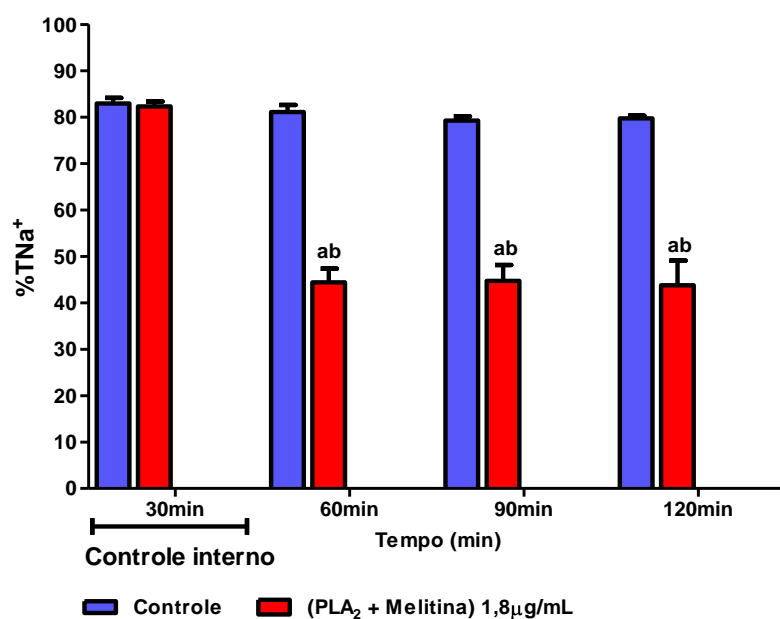


**Figura 36.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 11.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,599	0,054
60	0,707	0,051	0,561	0,117
90	0,633	0,051	0,773 <sup>ab</sup>	0,190 <sup>ab</sup>
120	0,697	0,084	0,794 <sup>ab</sup>	0,191 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

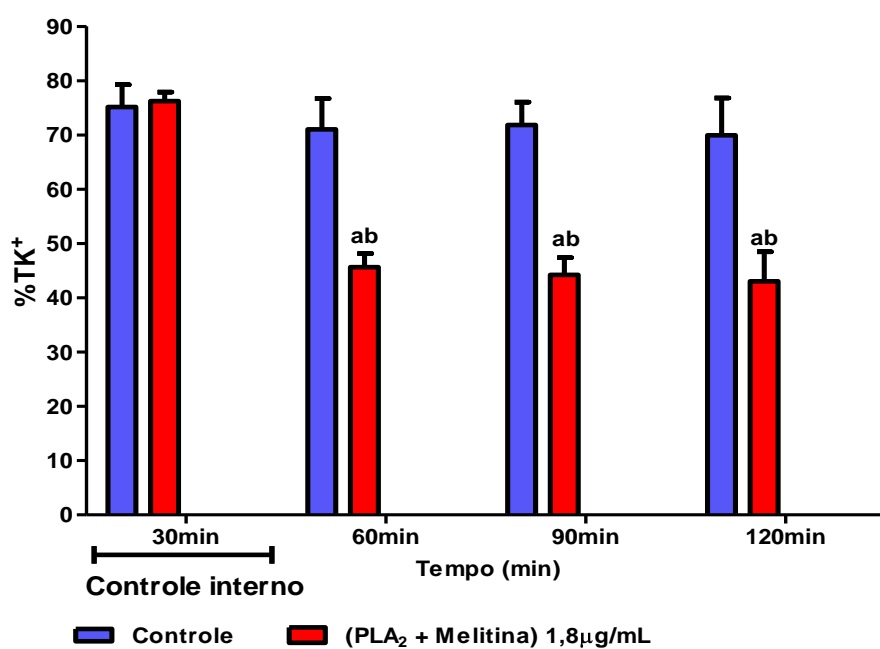


**Figura 37.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 12.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	82,30	1,70
60	81,11	1,52	63,22 <sup>ab</sup>	6,26 <sup>ab</sup>
90	79,26	0,90	51,57 <sup>ab</sup>	5,71 <sup>ab</sup>
120	79,76	0,56	43,73 <sup>ab</sup>	6,29 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

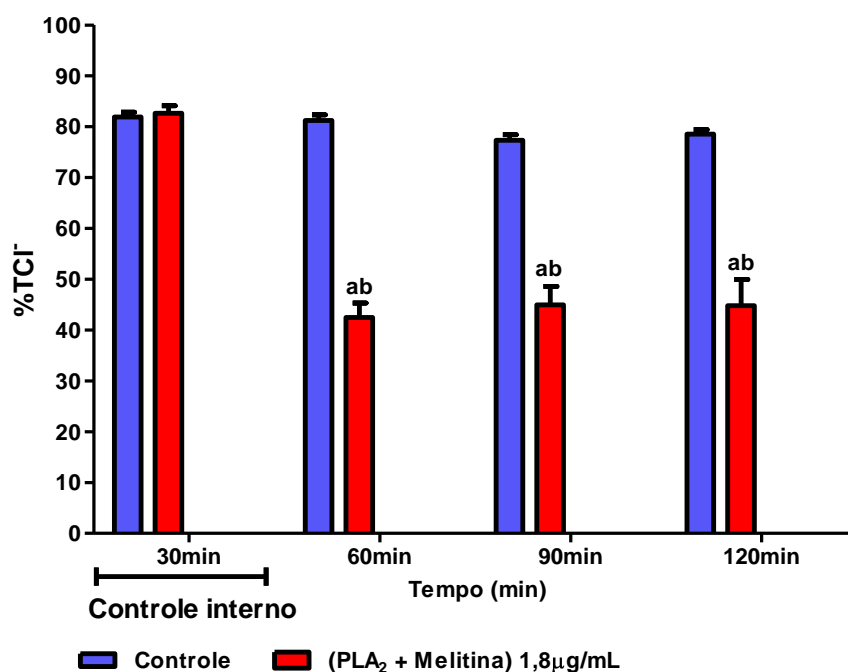


**Figura 38.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 13.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	69,13	4,14	75,64	3,01
60	69,04	5,68	54,56 <sup>ab</sup>	6,56 <sup>ab</sup>
90	71,84	4,21	48,00 <sup>ab</sup>	5,66 <sup>ab</sup>
120	69,94	6,86	42,32 <sup>ab</sup>	6,54 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 39.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de cloreto (%TCI<sup>-</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

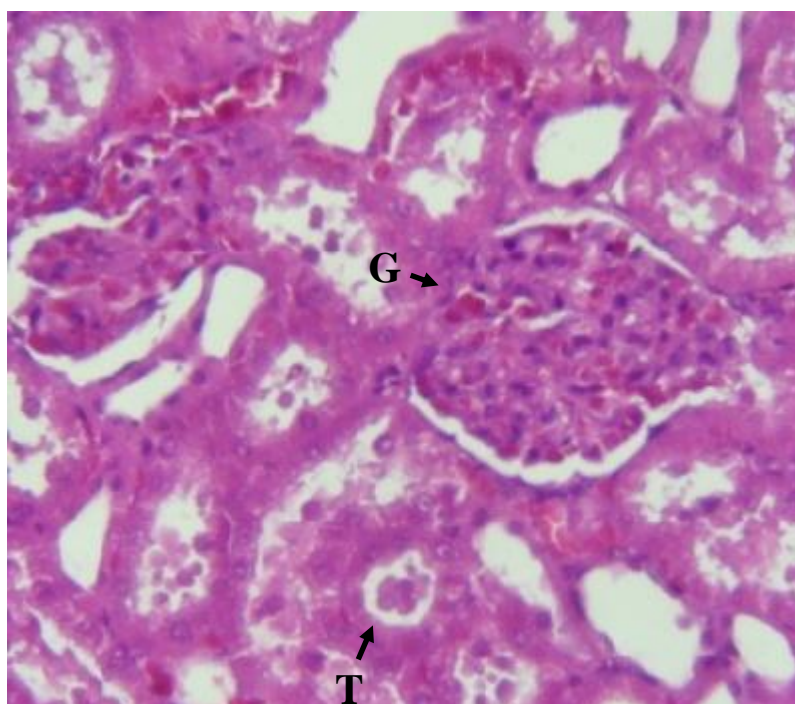
**Tabela 14.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	0,98	78,91	1,76
60	81,25	1,06	53,66 <sup>ab</sup>	8,68 <sup>ab</sup>
90	77,32	1,12	50,28 <sup>ab</sup>	5,25 <sup>ab</sup>
120	78,53	0,89	44,15 <sup>ab</sup>	6,12 <sup>ab</sup>

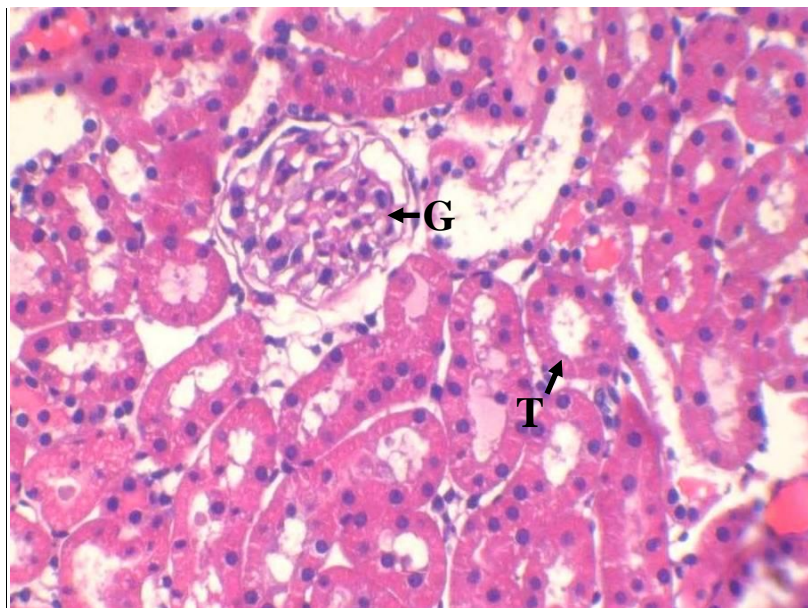
Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

#### 4.1.2 HISTOLOGIA DOS RINS PERFUNDIDOS COM VENENO TOTAL E FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + Melitina)

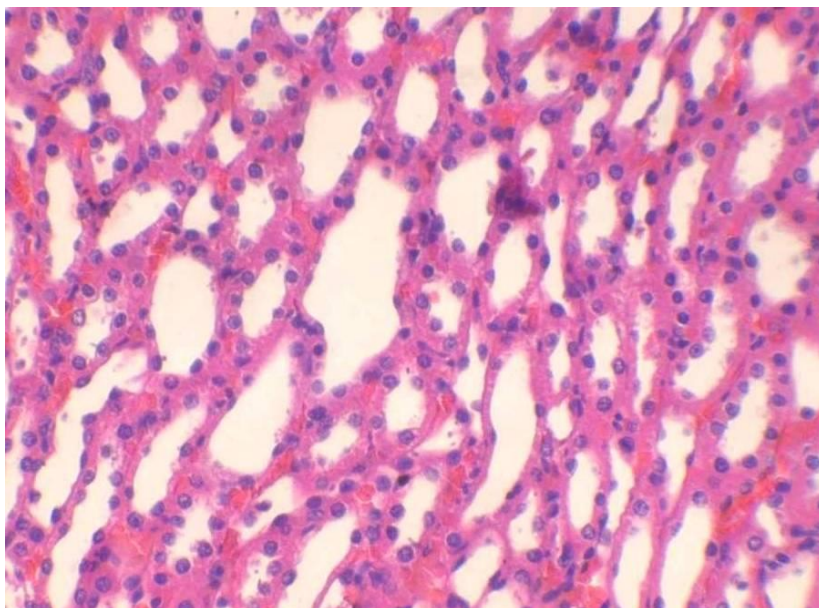
As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstício), assim como os rins do grupo controle perfundidos somente com solução de Krebs. (figuras 40, 41, 42 e 43).



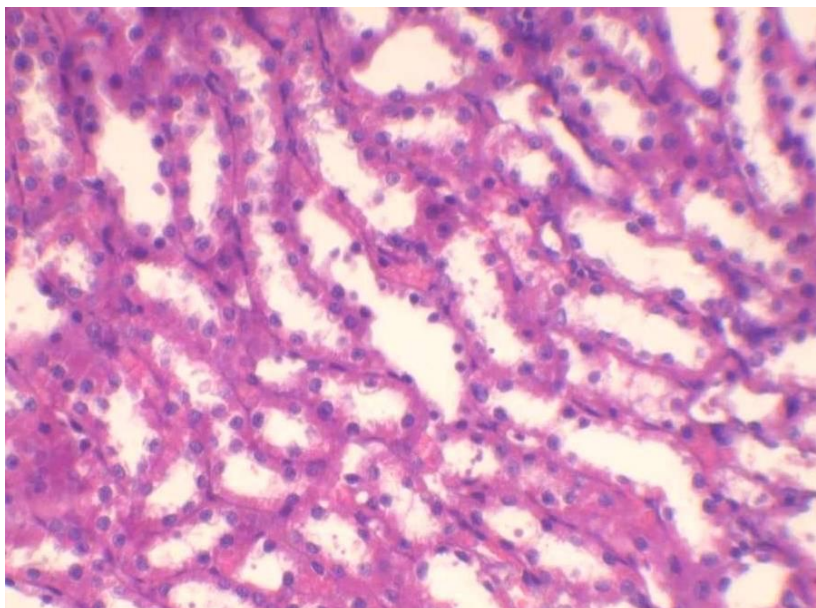
**Figura 40.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 41.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

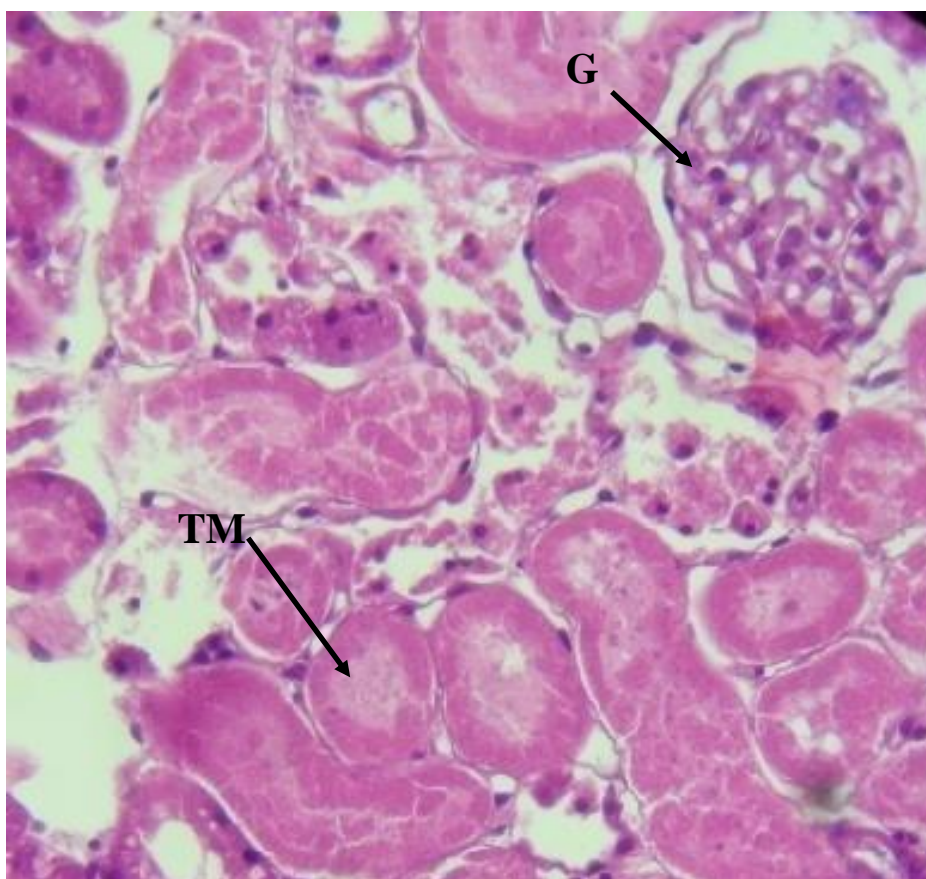


**Figura 42.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos contorcidos distais normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

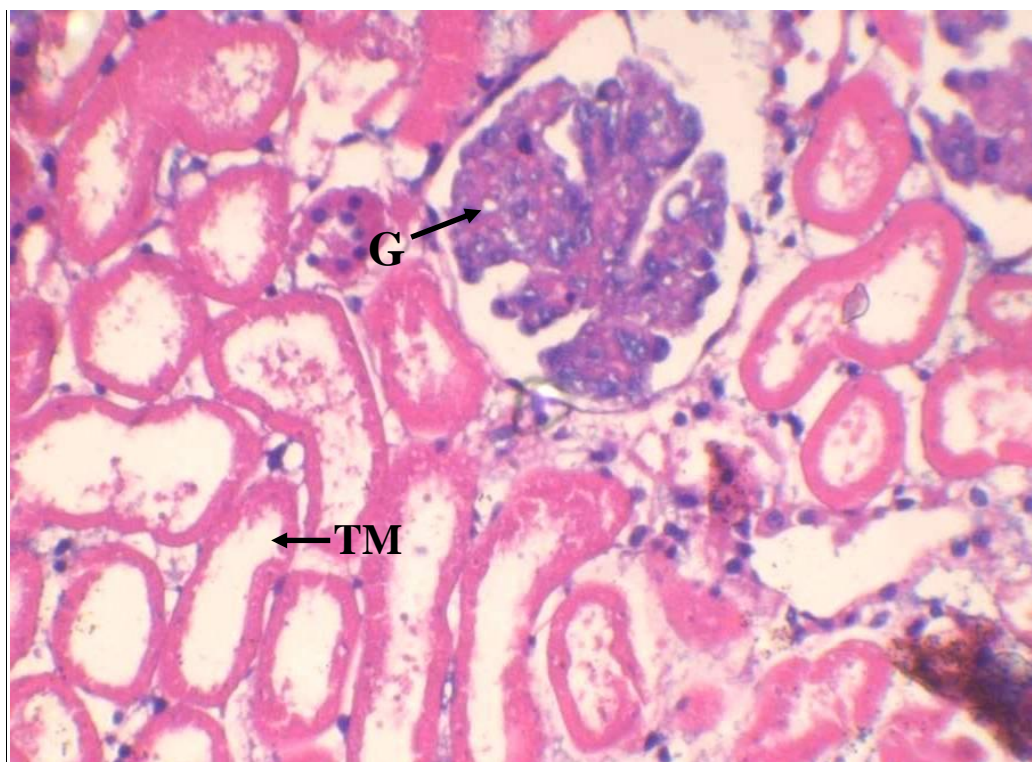


**Figura 43.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

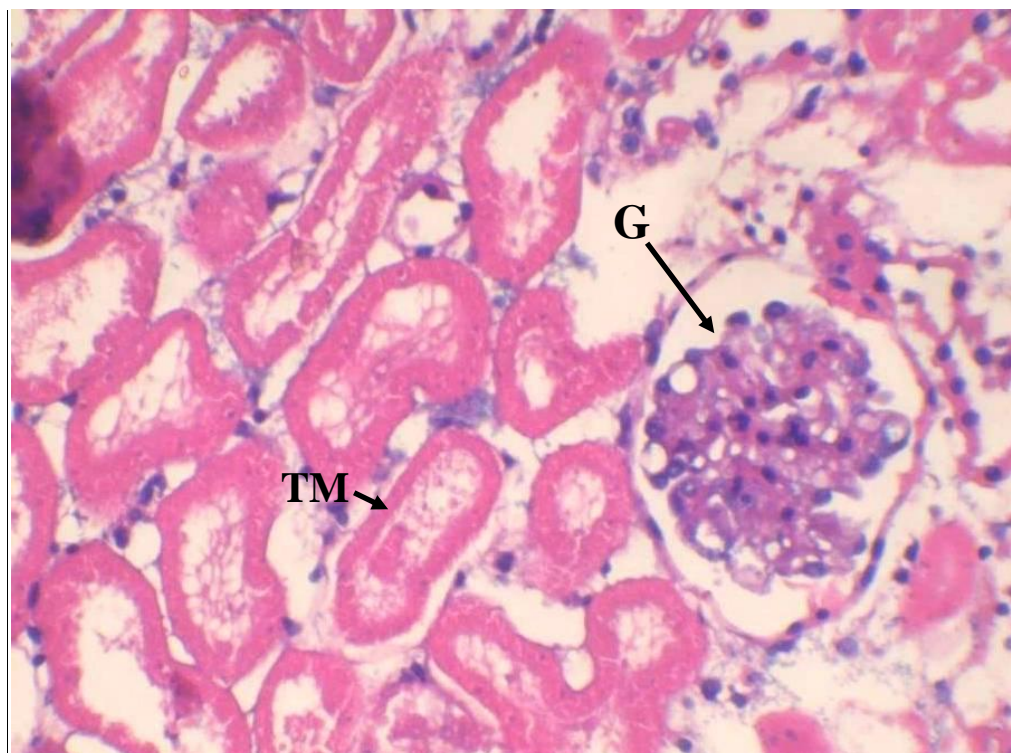
Nos túbulos renais apresentados nas figuras 44, 45, 46, e 47, observam-se depósitos intertubulares, verdadeiros cilindros e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose e apoptose/dano direto às células tubulares em todas as concentrações do veneno total de *Apis mellifera* estudadas. As outras estruturas como glomérulos, vasos e interstício permaneceram íntegras à microscopia de luz.



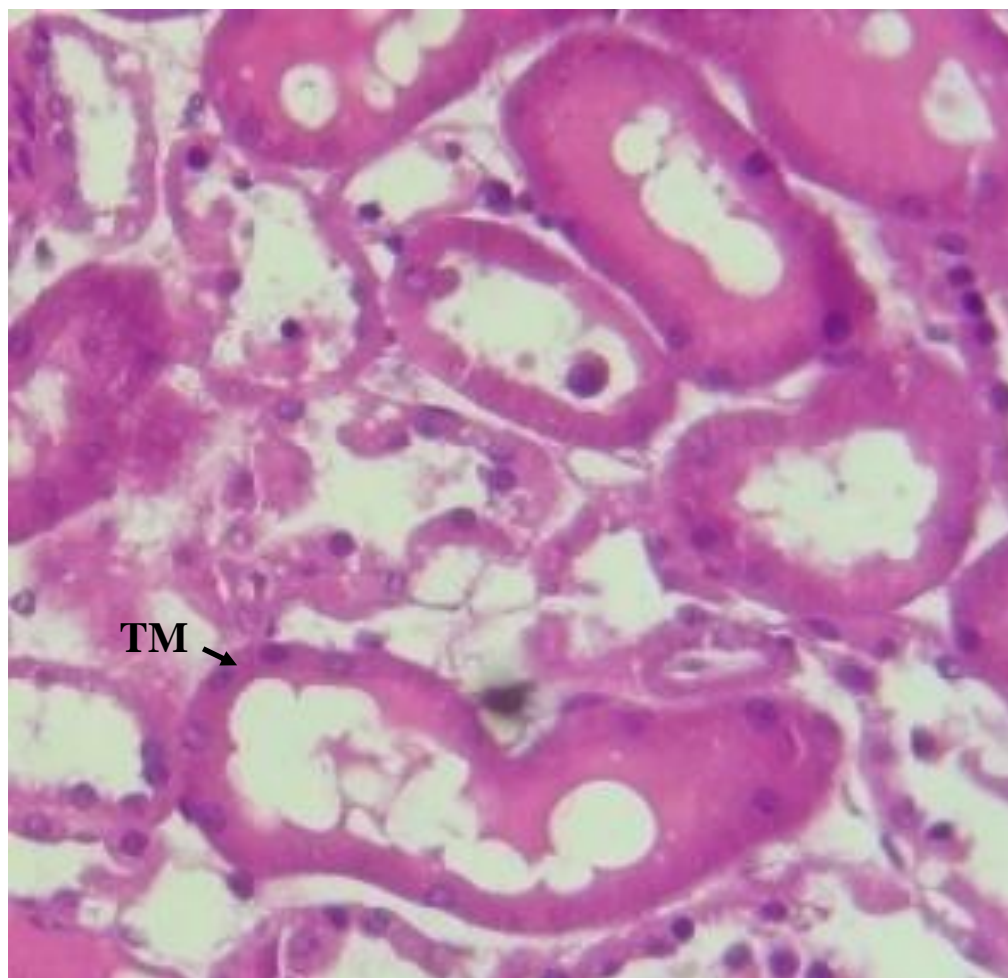
**Figura 44.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (1µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 45.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (3,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

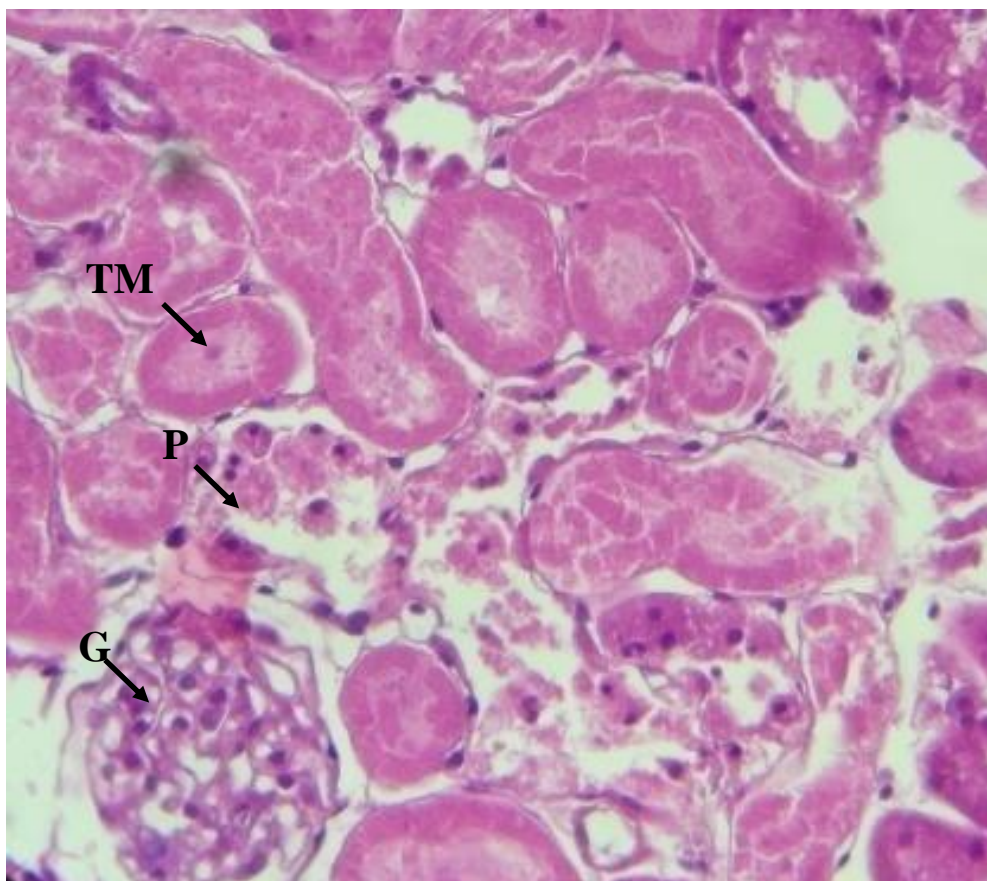


**Figura 46.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (10,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

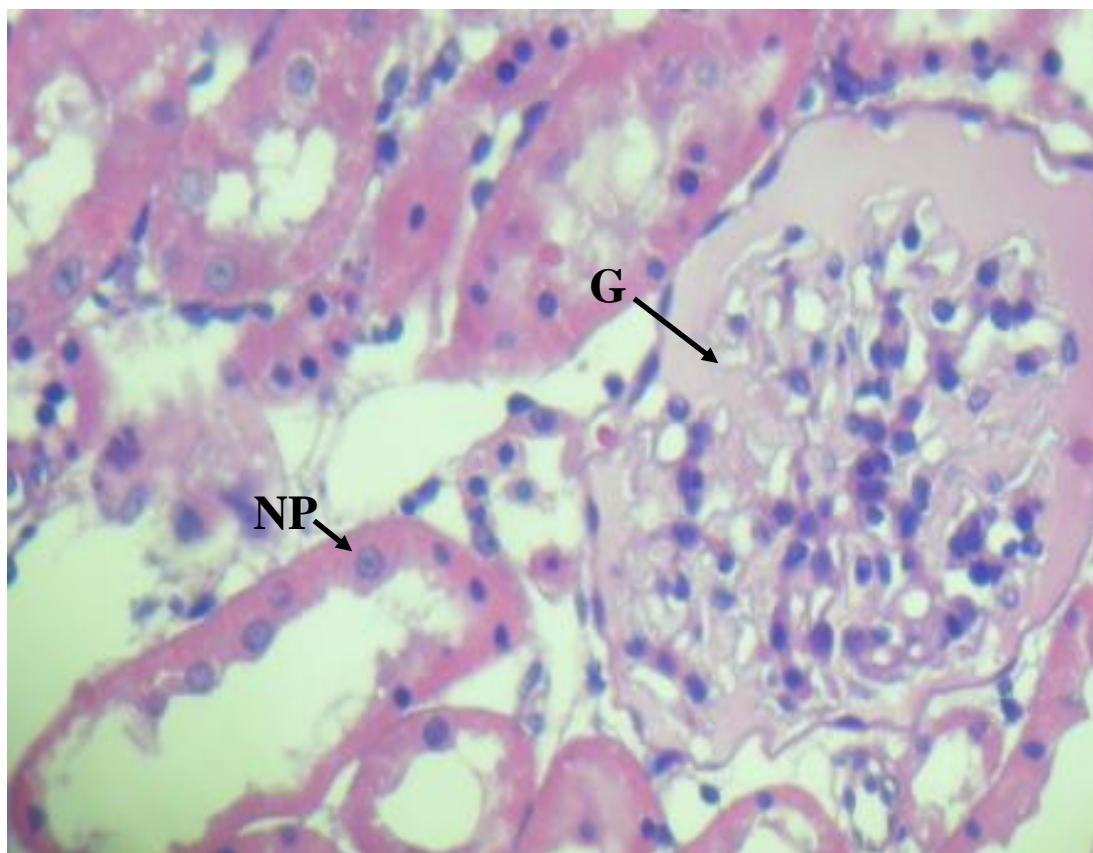


**Figura 47.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* ( $3\mu\text{g/mL}$ ) demonstrando túbulos dilatados, depósitos hialinos formando cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

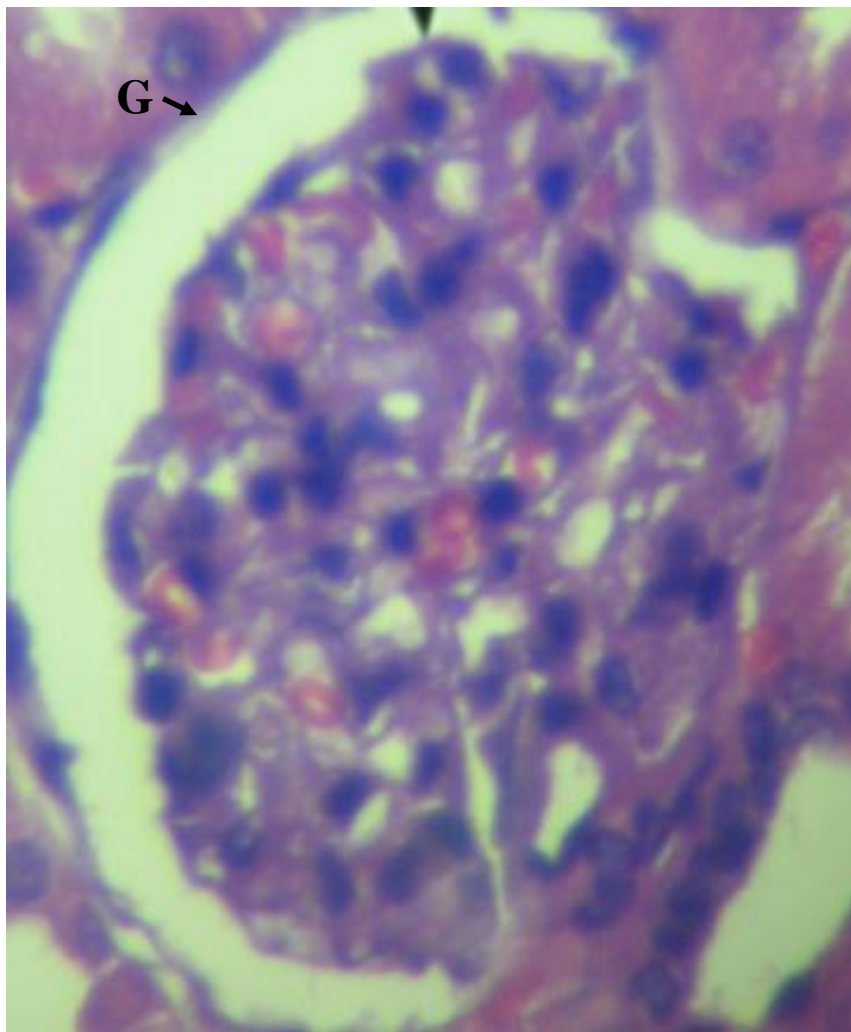
No túbulo renal apresentado na figura 48, observa-se depósito intertubular, verdadeiro cilindro e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose ou apoptose, no glomérulo apresentado nas figuras 49 e 50, observam-se discreta deposição de substâncias eosinofílica e material protéico, esse dano direto à célula tubular e glomerular na concentração de  $1,8\mu\text{g/mL}$  da fração complexada ( $\text{PLA}_2$  + melitina) de *Apis mellifera* estudada. As outras estruturas como vasos e interstício permaneceram íntegras à microscopia de luz.



**Figura 48.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações ( $\text{PLA}_2$  + melitina) do veneno de *Apis mellifera* ( $1,8\mu\text{g/mL}$ ) demonstrando túbulos dilatados com depósito intertubular, verdadeiros cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e plasmócito (P) (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 49.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo com elevada deposição de material protéico e presença de núcleos picnótico (NP) indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 1000X).

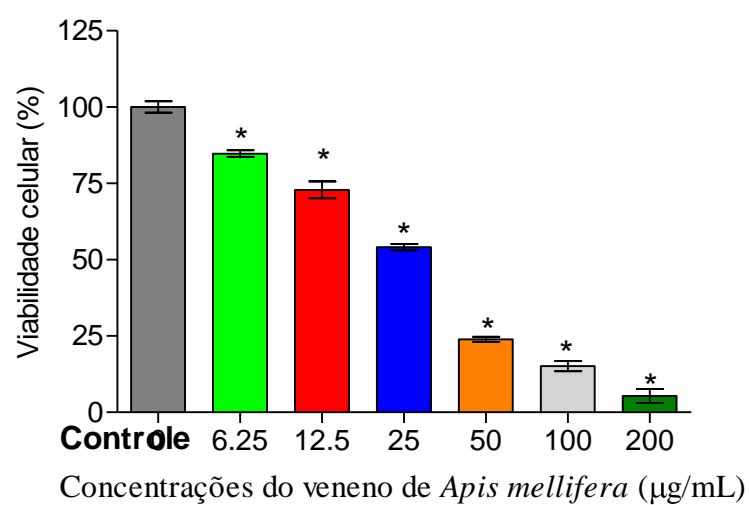


**Figura 50.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de substância eosinofílica (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 1000X).

## 4.2 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS

### 4.2.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE

O efeito do veneno total de *Apis mellifera* nas células tubulares renais foi avaliado através de culturas de células MDCK. A viabilidade das culturas tratadas ( $1,0 \times 10^5$  /poço) com veneno (6,25; 12,5; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 $\mu\text{g/mL}$ ) foi analisada pelo método MTT após 24h de incubação. Os resultados demonstraram um efeito citotóxico dependente da concentração do veneno, com valor da  $CI_{50}$  47.84 $\mu\text{g/mL}$  (Figura 51 e tabela 15). As fotomicrografias das células MDCK também permitem demonstrar a morte celular induzida pelo veneno de *Apis mellifera*. Na figura 52 podem ser visualizadas células pertencentes ao grupo controle negativo, enquanto que na figura 53 verifica-se o padrão de morte celular induzido pelo veneno testado.

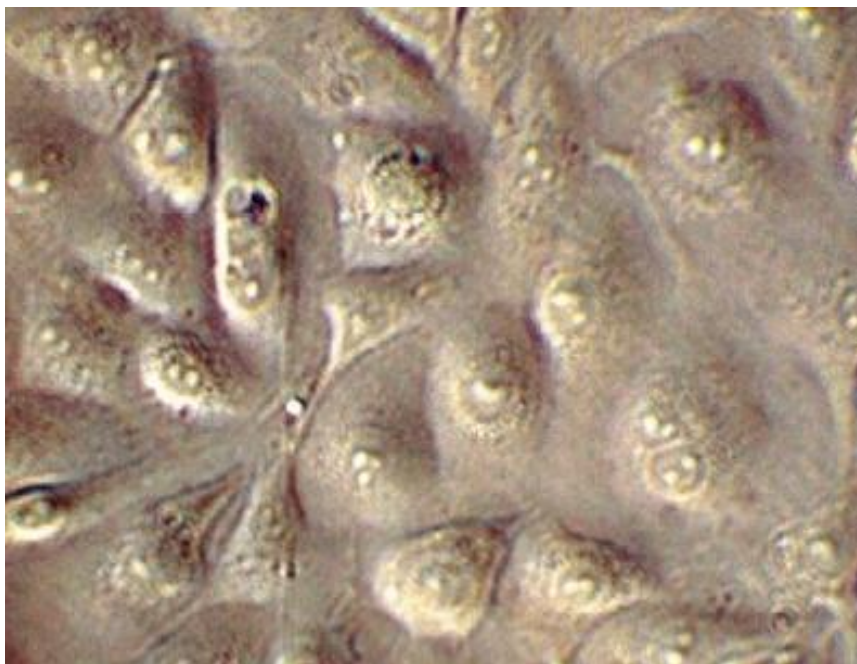


**Figura 51.** Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

**Tabela 15.** Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).

Grupos experimentais													
Controle		VAM 6,25µg/mL		VAM 12,50µg/mL		VAM 25,00µg/mL		VAM 50,00µg/mL		VAM 100,0µg/mL		VAM 200,00µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,00	1,86	84,79*	1,06	79,06*	1,24	66,75*	1,31	52,93*	2,16	39,50*	3,28	5,38*	2,28

Os resultados dos experimentos (n=3 – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), em % de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle negativo (ANOVA – Tukey).

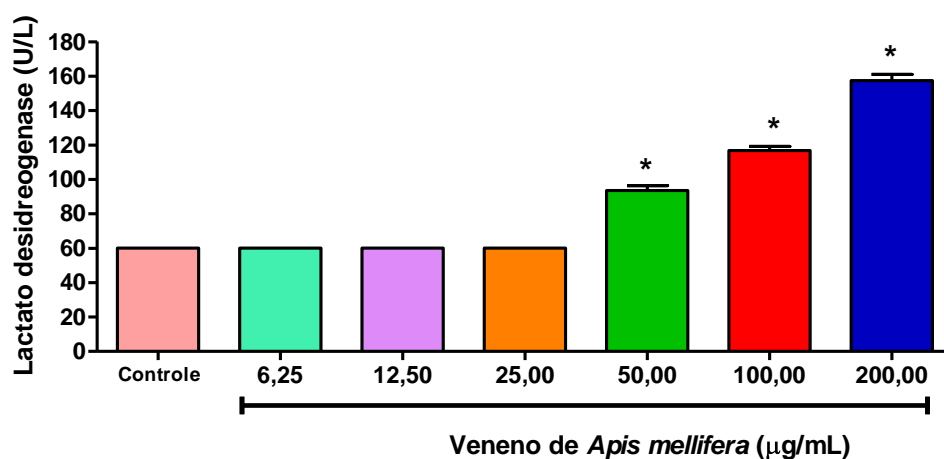


**Figura 52.** Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).



**Figura 53.** Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno total de *Apis mellifera*, (50,0 µg/mL), presença de agrupamento celular e citoplasma granuloso e demonstrando o padrão de morte celular observado, onde A representa as células expostas ao VAM (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).

Para investigar se o veneno foi capaz de alterar a integridade da membrana foram mensurados os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e foi observado um aumento significativo nas maiores concentrações estudadas, corroborando assim com as alterações morfológicas observadas em culturas de células. Esses resultados podem ser visualizados na figura 54 e na tabela 16.



**Figura 54.** Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de U/L (unidades por litro). “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

**Tabela 16.** Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de ( 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).

Grupos experimentais													
Controle		VAM 6,25µg/mL		VAM 12,50µg/mL		VAM 25,00µg/mL		VAM 50,00µg/mL		VAM 100,0µg/mL		VAM 200,00µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
32,78	2,66	47,49*	9,36	45,49	13,55	42,16	12,02	66,81*	11,65	72,78*	4,80	87,44*	3,53

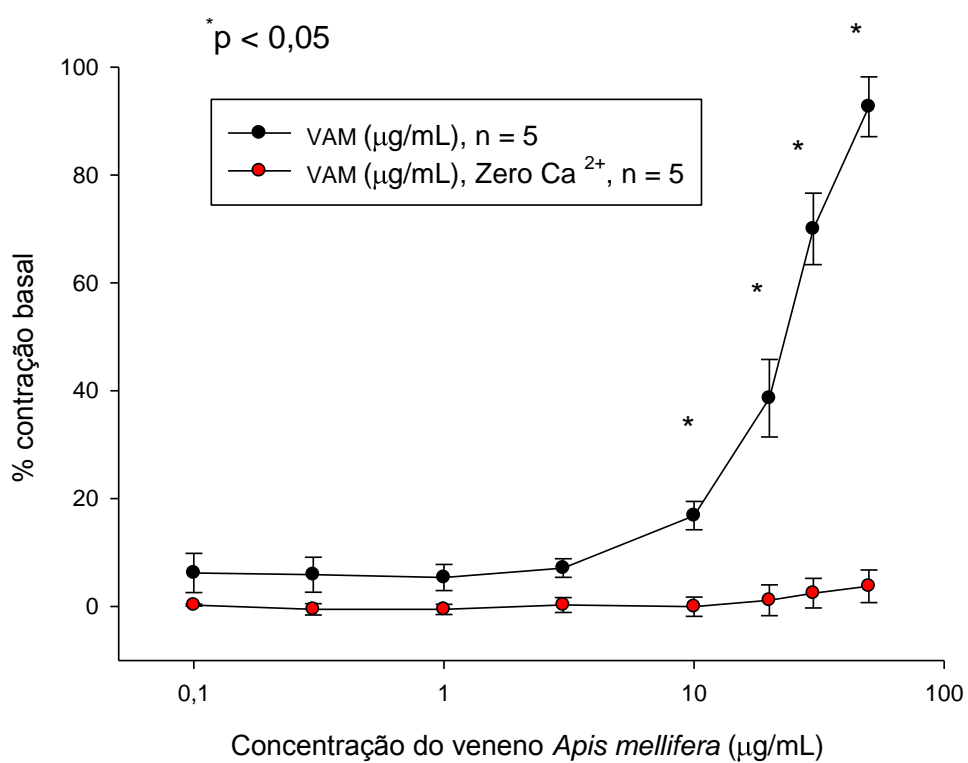
Os resultados dos experimentos (n=3 – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) e em U/L (ANOVA – Tukey).

### 4.3 ANEL DE AORTA COM ENDOTÉLIO

#### 4.3.1 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL DE AORTA ISOLADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE CÁLCIO

O veneno total da abelha *Apis mellifera* nas concentrações de (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu$ g/mL), adicionado cumulativamente, produziu, de maneira concentração dependente, um aumento do tônus basal da aorta isolada com magnitude correspondente a  $137 \pm 14,6\%$  (n=5) em relação à contração de referência induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>, como demonstrado na figura 55.

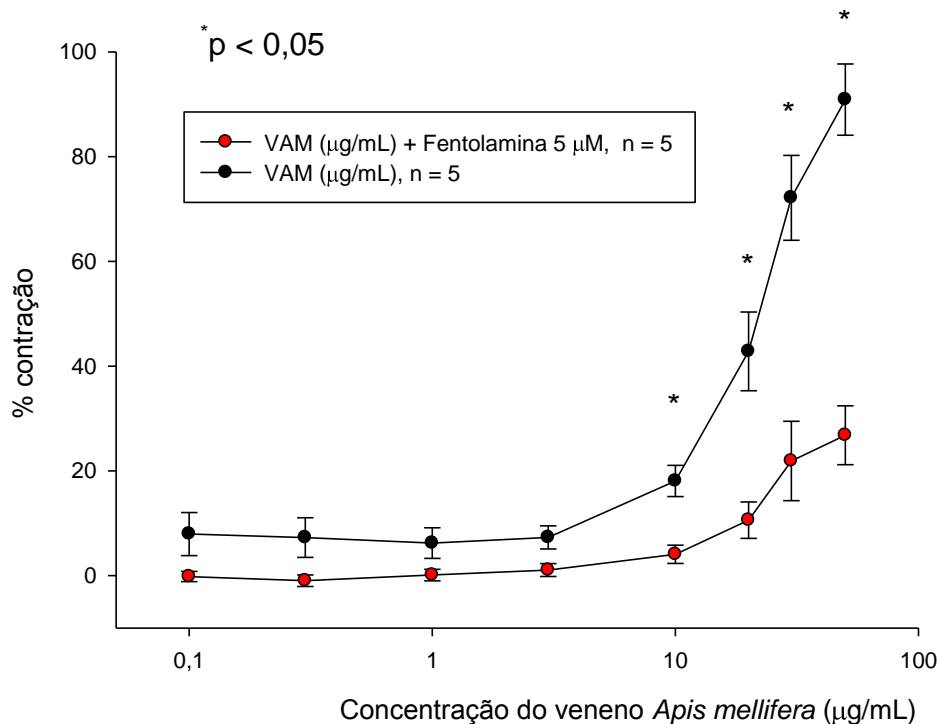
Para avaliar o envolvimento do cálcio extracelular no efeito do veneno a preparação foi mantida em meio sem cálcio e na presença de EGTA (1mM). O efeito vasoconstrictor do veneno total de *Apis mellifera* foi significativamente reduzido nas concentrações 3, 10 e 20 $\mu$ g/mL (Figura 55).



**Figura 55.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  1mM ( ● ,  $n=5$ ; 0,1-50 $\mu\text{g/mL}$ ) e na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  1mM ( ● ,  $n=5$ ; 0,1-50 $\mu\text{g/mL}$ ). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

### 4.3.2 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE FENTOLAMINA

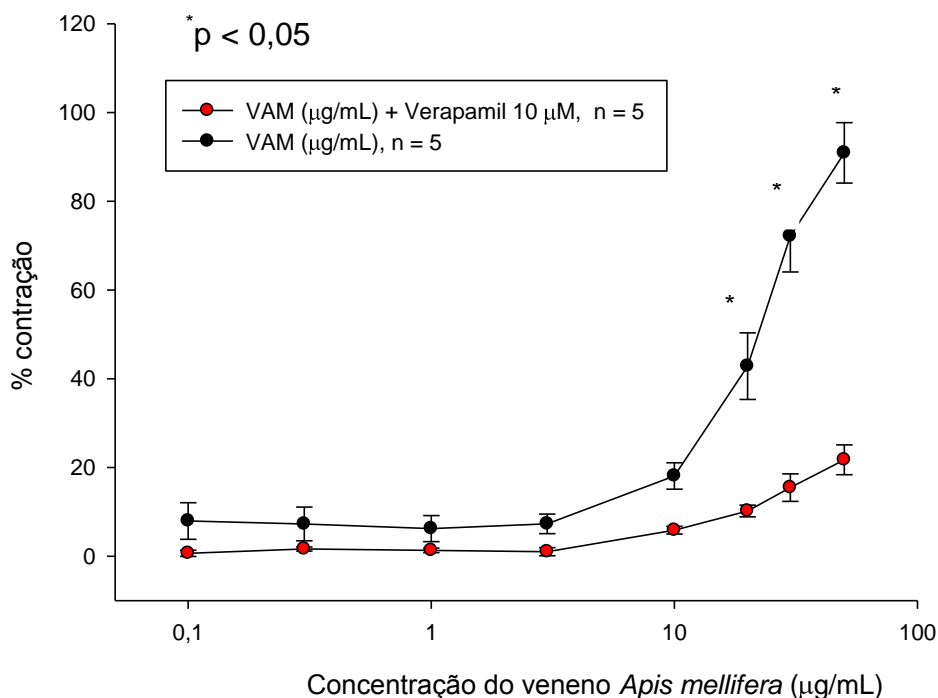
Para avaliar o envolvimento de receptores adrenérgicos no efeito contrátil do veneno foi adicionada fentolamina (5 $\mu$ M) que reduziu significativamente o efeito produzido pelo veneno (figura 56).



**Figura 56.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem fentolamina (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de fentolamina (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \* p < 0,05.

### 4.3.3 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE VERAPAMIL

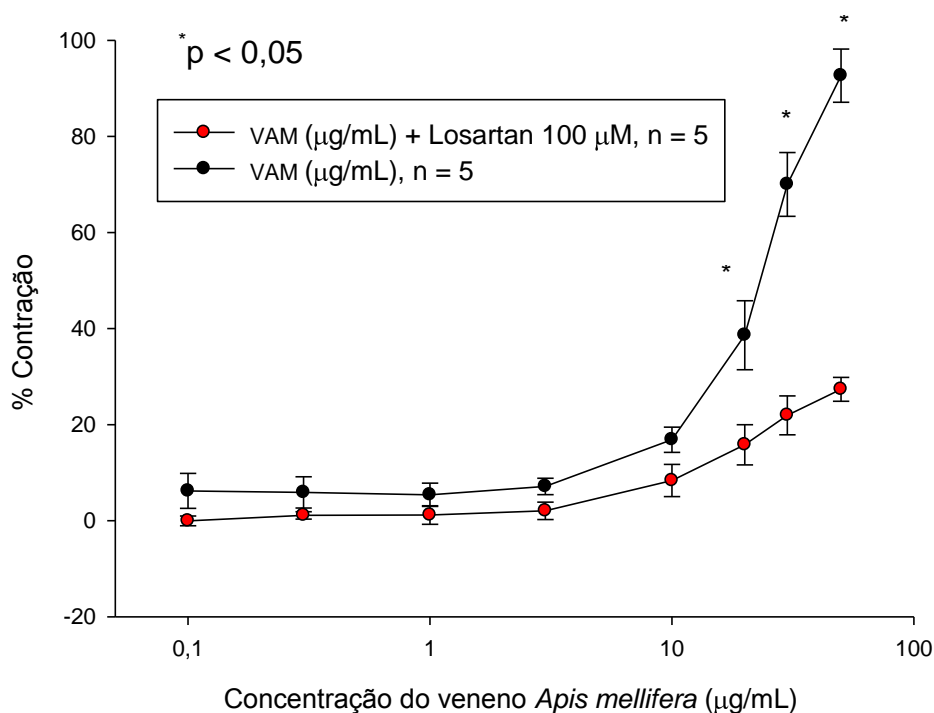
A adição prévia de verapamil (10  $\mu$ M), um bloqueador dos canais de cálcio, também reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 10, 20, 30 e 50 $\mu$ g/mL, conforme demonstrado na figura 57.



**Figura 57.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem verapamil (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de verapamil (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE LOSARTAN

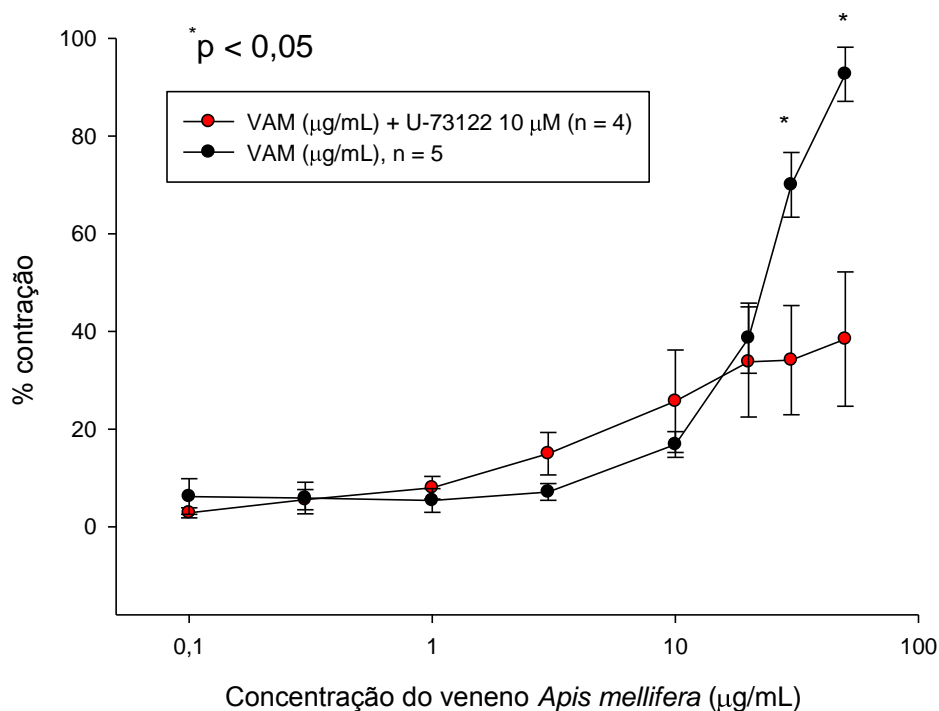
Na busca do entendimento da ação do veneno total de *Apis mellifera* sobre o tecido de aorta, foi adicionado losartan (100  $\mu$ M), um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II. Também reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 10, 20, 30 e 50  $\mu$ g/mL, conforme demonstrado na figura 58.



**Figura 58.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem losartana (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de losartan (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M., ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.5 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE INIBIDOR DA FOSFOLIPASE C (U – 73122)

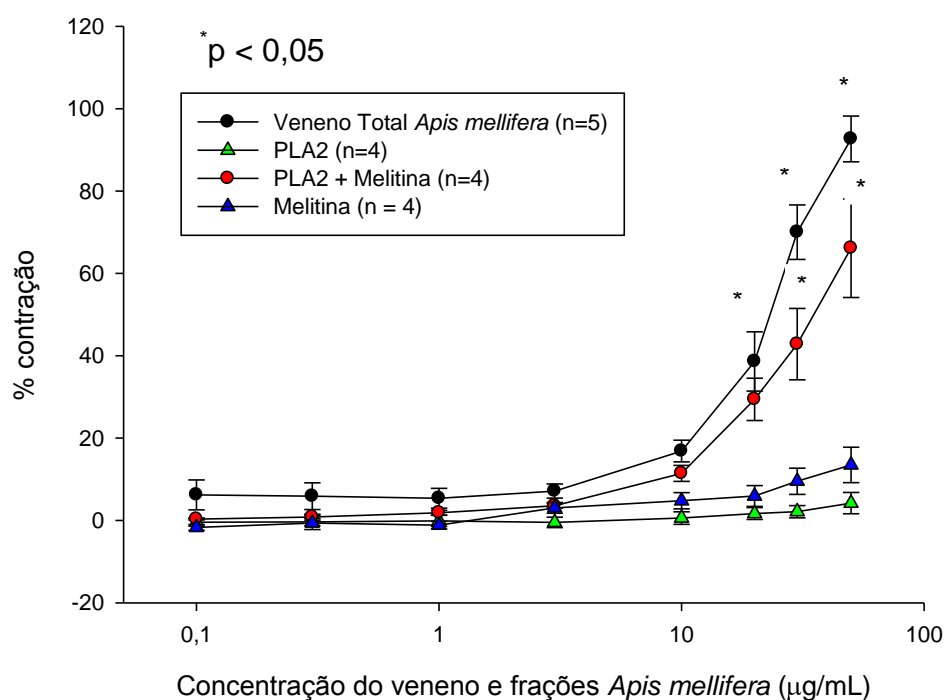
Um inibidor de fosfolipase C (U-73122, 10 $\mu$ M), após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, seguida da adição do veneno, reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 20, 30 e 50 $\mu$ g/mL (Figura 59).



**Figura 59.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem inibidor de fosfolipase C ( $\bullet$ , n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de inibidor de fosfolipase C ( $\bullet$ , n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.6 EFEITO DAS FRAÇÕES PLA<sub>2</sub> E MELITINA ISOLADAS, E EFEITO DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + MELITINA) DO VENENO DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL

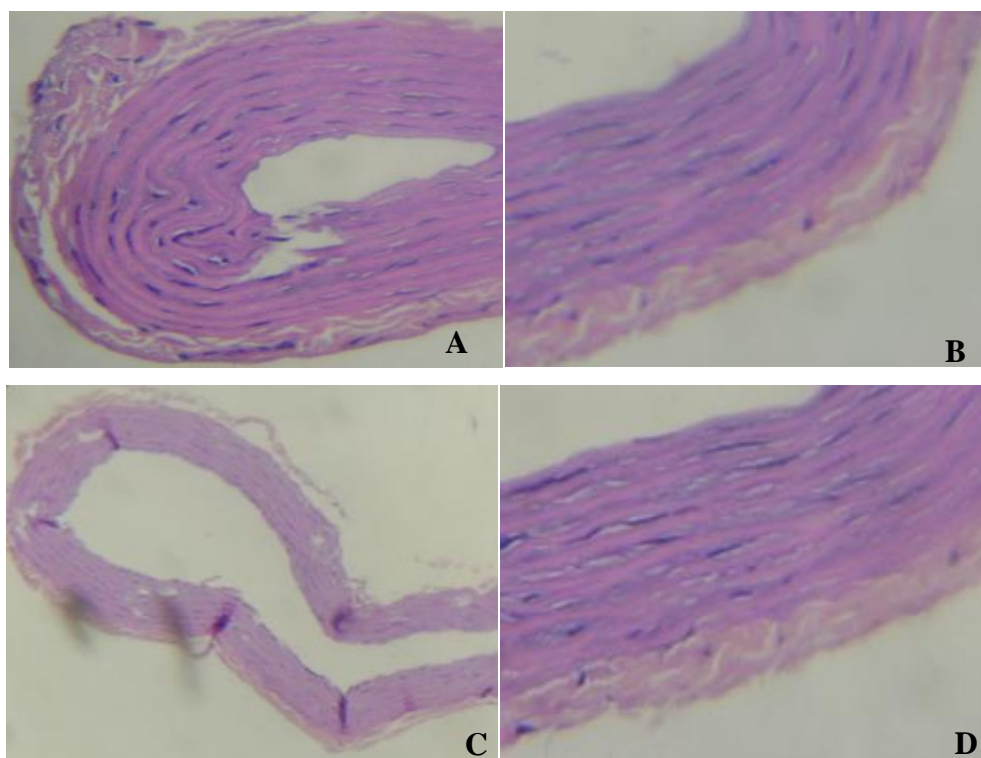
A fração complexada (PLA<sub>2</sub> + Melitina) da abelha *Apis mellifera* (0,1–50,0µg/mL), produziu um aumento do tônus basal da aorta isolada semelhante ao veneno total, demonstrando a relação do efeito à ligação dos peptídeos na forma complexada, no entanto, as frações isoladas não alteraram o tônus basal, como demonstrado na figura 60.



**Figura 60.** Curva concentração-efeito em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca<sup>2+</sup> 1mM com veneno total de *Apis mellifera* (●, n=5; 0,1-50µg/mL), com a fração complexada PLA<sub>2</sub>+ melitina (●, n=5; 0,1-50µg/mL), com a fração isolada de PLA<sub>2</sub> (●, n=5; 0,1-50µg/mL) e com a fração isolada de melitina (●, n=5; 0,1-50µg/mL). Valores expressos em média ± E.P.M., ANOVA, Holme-Sidak  $p < 0,05$ .

#### 4.4 HISTOLOGIA DOS ANÉIS DE AORTA

Em nenhum dos protocolos observaram-se alterações histológicas no anel de aorta, seja nos grupos controle ou nos grupos expostos ao veneno de *Apis mellifera*; independentemente da concentração de VAM estudada (figura 61).



**Figura 61.** Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado. Onde “**A**” representa o grupo controle, “**B**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração  $PLA_2$  do veneno *Apis mellifera* (VAM), “**C**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração melitina do veneno *Apis mellifera* (VAM), “**D**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração complexada  $PLA_2$  + melitina do veneno *Apis mellifera* (VAM), (n=4 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

# DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

*O mais sábio é aquele que sabe que não sabe*

*Sócrates*

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No Brasil, em 1956, devido as abelhas africanizadas terem escapado de cativeiros, houve uma disseminação dessa espécie por todo o continente americano. Estes insetos são únicos em seu comportamento agressivo, caracterizando-se por ataques maciços com grande quantidade de veneno injetada em suas vítimas. Os acidentes com esses insetos apresentam certa severidade, com um número elevado de pacientes evoluindo com complicações graves ou óbito, incluindo injúrias renais (PENTEADO *et al.*, 2003).

Os acidentes por ferroadas de abelhas apresentam distintas manifestações clínicas, dependendo da sensibilidade do indivíduo ao veneno e do número de ferroadas (ALMEIDA *et al.*, 2011). Devido ao crescente número de acidentes com abelha *Apis mellifera* no Brasil e na América Latina, verifica-se a importância de estudos que tentam demonstrar evidências desse tipo de complicações, bem como seus possíveis mecanismos fisiopatológicos.

No presente estudo, ensaios com perfusão renal, foi verificado que o veneno total de *Apis mellifera* induziu aumento na pressão de perfusão em rim isolado de rato, apresentando alterações similares às encontradas por Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011) ao estudarem as espécies do tipo escorpião *Tityus serrulatus* e vespa *Polybia paulista*, respectivamente. É importante salientar que esses trabalhos descritos na literatura utilizam o mesmo modelo experimental, demonstrando efeitos similares com venenos de outra família e outros artrópodes.

Os resultados com infusão do veneno bruto de *Apis mellifera* em rim isolado, demonstraram aumento da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. O efeito do veneno sobre a resistência renal foi provavelmente o responsável por esse aumento na filtração glomerular, levando ao conseqüente aumento do fluxo urinário. Todos esses fatores decorrem em virtude do processo de filtração renal depender de diversos fatores que interagem a nível glomerular, tais como, alterações na pressão de perfusão, influenciada pela resistência vascular. Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011)

demonstraram que o veneno total do escorpião *Tityus serrulatus* e da vespa *Polybia paulista* foram capazes de induzir diversas alterações na função renal, como aumento na pressão de perfusão, na resistência vascular renal, no fluxo urinário e no ritmo de filtração glomerular, bem como redução no percentual de transporte total de sódio, potássio e cloreto.

Em relação à excreção de eletrólitos, pode-se observar que o veneno total de *Apis mellifera* age de forma regular, com potente natriurese e diurese pressórica. A observação de danos diretos nos túbulos renais pode ser, dependendo de sua intensidade, irreversível (VIKRANT *et al.*, 2005). No presente estudo, verificou-se uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, sugerindo que a toxina da abelha *Apis mellifera* exerça injúria sobre os túbulos renais.

Acidentes com *Hymenoptera* geralmente provocam o aumento da pressão de perfusão renal, que é ocasionada provavelmente pelo excesso de liberação de catecolaminas e outros compostos biologicamente ativos presentes no veneno (STRASSER *et al.*, 1992). Além disso, o acidente com abelhas pode induzir a liberação endógena dessas substâncias por componentes da peçonha, como as fosfolipases A<sub>2</sub> (GRISOTTO *et al.*, 2006).

Para manter o fluxo sanguíneo renal constante, a pressão arterial renal pode variar de 80 a 200mmHg. Quando a pressão renal aumenta, o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular tendem a aumentar, provavelmente por ativação de receptores adrenérgicos (EATON; POOLER, 2008).

As arteríolas aferentes e eferentes possuem inervação simpática que provoca vasoconstrição pela ativação de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, porém, as arteríolas aferentes apresentam uma maior densidade destes receptores (STRASSER *et al.*, 1992). Existe no rim uma densa inervação adrenérgica e uma intensa produção de catecolaminas, as quais, quando liberadas, regulam a hemodinâmica renal predominantemente com vasoconstrição, mediada por receptores  $\alpha$ 1 e via proteína G (Gq). Quando esse receptor é ativado, aumenta a resistência vascular, afeta a

redistribuição do fluxo sanguíneo cortical para regiões mais medulares e eleva a síntese de renina (AWE e ADEAGBO, 2007).

SCHWINN *et al.*, (2004), ao analisar o rim, além de encontrarem aumento da expressão de RNAm para o receptor subtipo  $\alpha 1b$ , observaram que antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos auxiliam no relaxamento e vasodilatação do músculo liso, podendo levar a alterações na função erétil através da via receptor  $\alpha 1d$ . No entanto, outros autores também sugerem a participação de receptores  $\alpha 1a$  e  $\alpha 1d$ . Dessa forma, os três subtipos de receptores contribuem para a resposta constrictora em rins perfundidos (AWE e ADEAGBO, 2007).

A pressão arterial renal, fisiologicamente, pode variar no intuito de manter o fluxo sanguíneo renal constante. A pressão de perfusão renal está relacionada diretamente com o fluxo e o ritmo de filtração glomerular, provavelmente, pela ativação de receptores adrenérgicos presentes nas arteríolas renais e em outros leitos vasculares. Assim, sugere-se que o efeito vasoconstritor da arteríola eferente reduz a saída de sangue do glomérulo, levando ao aumento na resistência dos capilares glomerulares e conseqüentemente do filtrado glomerular (JOHNSON, 2000). Dessa forma, as alterações renais encontradas no presente estudo sugerem a participação de receptores adrenérgicos.

Com o estudo das duas principais frações constituintes do veneno, foi possível verificar que as alterações renais se devem à soma das duas frações complexadas ( $PLA_2$  + Melitina), pois o complexo de fração seria o principal responsável pelos efeitos vasculares de pressão de perfusão, resistência vascular, aumento do fluxo urinário e diminuição do transporte de eletrólitos. Relata-se que as toxinas presentes no veneno liberam quantidades maciças de catecolaminas responsáveis pelos efeitos supra-citados. Esses resultados também podem ser objetos de interação das toxinas isoladas com o sistema adrenérgico, entretanto, o bloqueio dos efeitos com o antagonista  $\alpha$ -adrenérgico não foi realizado em perfusão renal.

A insuficiência renal aguda (IRA) pode ser caracterizada por uma deterioração na função renal, deterioração que acontece no intervalo de horas a dias, resultando na falência dos rins em excretar produtos nitrogenados e em manter o equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-básico (YU *et al.*, 2007).

Das e Mukherjee (2008) sugeriram em estudos experimentais e clínicos que a patogênese das lesões renais induzidas por venenos de abelha está relacionada com a ocorrência de vasoconstrição, toxicidade direta e rabdomiólise nas células tubulares renais.

A rabdomiólise está relacionada como uma das causas da falência renal aguda. É uma síndrome que pode ser ocasionada por inúmeras fatores, e, dentre eles, pode-se citar: trauma muscular, imobilização prolongada, estado de mal convulsivo, hipertermia maligna, exercício físico extenuante, exposição à drogas e ataques de abelhas africanizadas (FIGHERA *et al.*, 2007). Sendo assim, a rabdomiólise pode ser caracterizada por lesão muscular extensa com liberação de inúmeras substâncias intracelulares na circulação, tais como: creatinina fosfoquinase (CPK), lactato desidrogenase (LDH), mioglobina e aspartato transaminase AST. . No entanto, nos modelos realizados no presente estudo não foi possível visualizar rabdomiólise (VANHOLDER *et al.*, 2000).

Daher *et al* (2009), ao fazer uma revisão de evenenamentos por ferroadas de abelhas, observou hemólise e rabdomiólise em 50% dos casos avaliados. Segundo dados da literatura, a quantidade de ferroadas é importante para a evolução do quadro clínico. Acidentes com mais de 500 ferroadas evoluem com rabdomiólise e IRA, e, nesses casos, faz-se necessário o tratamento dialítico. No entanto, mesmo na vigência de tratamento dialítico, a mortalidade média nesses casos gira em torno de 20% (THIRUVENTHIRAN *et al.*, 1999)

É importante salientar que a IRA causada por rabdomiólise induzida por ferroadas de abelhas africanizadas é grave e está associada a uma elevada mortalidade, devendo ser tratada precocemente (DAHER *et al.*, 2009).

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao envolvimento do rim não estão bem esclarecidos. A insuficiência renal aguda que ocorre após ataques maciços de abelhas pode estar associada a mecanismos tóxicos-isquêmicos com choque hipovolêmico e anafilático, os quais estão relacionados à lesão tubular por pigmentos. A presença desses pigmentos ocorre devido à lesão muscular (mioglobinúria), hemólise (hemoglobinúria) e efeito tóxico direto do veneno (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A falência renal aguda, associada à necrose tubular aguda, também é uma complicação frequente. Esse quadro parece ser devido aos efeitos interativos dos componentes do veneno, principalmente melitina e fosfolipase  $A_2$ , que atuam nas membranas biológicas. A mioglobinúria presente em casos de falência renal se dá devido a mecanismos isquêmicos (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Na avaliação histopatológica de rins perfundidos, revelam-se depósitos intertubulares, verdadeiros cilindros e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose e/ou apoptose às células tubulares em todas as concentrações do veneno total de *Apis mellifera* estudadas. As outras estruturas como glomérulos, vasos e interstícios permaneceram íntegras à microscopia de luz.

A observação histopatológica de rins perfundidos com a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) de *Apis mellifera*, também verificou alterações nos túbulos renais similares a apresentada quando exposta ao veneno total. No entanto, na região glomerular exposta à fração (PLA<sub>2</sub> + melitina), observou-se discreta deposição de substâncias eosinofílica e material protéico. As outras estruturas como vasos e interstícios permaneceram íntegras à microscopia de luz. Assim, a toxicidade direta do veneno e os efeitos vasculares encontrados, como o aumento pressórico renal, podem ter sido responsáveis pela passagem de proteínas dos capilares para o filtrado glomerular e pelo dano verificado a nível renal.

Conforme foi destacado, as análises histológicas realizadas com rins perfundidos demonstram que as células dos túbulos renais, de um modo geral, se

apresentam com núcleos picnóticos ou anucleados. Esses achados histológicos são sugestivos de apoptose e/ou necrose.

O veneno da abelha *Apis mellifera*, de um modo geral, demonstrou ser capaz de promover aumento na pressão de perfusão e resistência vascular renal, levando, conseqüentemente, à elevação do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. Essas alterações foram acompanhadas de perda da função de transporte tubular de eletrólitos (sódio, potássio e cloreto), demonstrando, assim, uma injúria a nível tubular comprovada pela histologia.

Esses resultados histológicos corroboram com os achados de Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011), já que em perfusão de rim isolado com o veneno de escorpião e vespas, respectivamente, foram observados picos pressóricos e depósito protéico nas estruturas renais similares ao encontrado neste trabalho. Grisotto *et al.*, (2006) ao realizar estudo com o veneno de abelhas, também observou extravasamento de proteínas para os túbulos renais.

Então, os dados descritos anteriormente indicam que o veneno da abelha *Apis mellifera* é capaz de induzir lesões diretas e/ou indiretas aos túbulos renais, podendo haver íntima relação dessas lesões com o desencadeamento de uma possível insuficiência renal aguda após acidentes com abelha africanizada.

Em função das alterações histológicas e dos parâmetros funcionais encontrados nos rins perfundidos com veneno da abelha *Apis mellifera*, foi avaliada a citotoxicidade induzida pelo veneno em cultura de células renais, mais especificamente com células do epitélio tubular (MDCK).

Os ensaios realizados com células MDCK reforçam a ação deletéria do veneno em células tubulares. Com esses experimentos, observou-se que o veneno na concentração de 50µg/mL é capaz de destruir quase 80% das células presentes na placa, pois, o veneno causou dano às células renais reduzindo a viabilidade celular. As determinações da atividade da enzima LDH sugerem que a morte celular é consequência da necrose e não da apoptose, pois, foi verificado que a perda da

integridade é acompanhada pelo aumento do lactato desidrogenase (LDH), confirmando o achado histológico realizado em rins perfundidos com veneno.

Corroborando com essa idéia, Vinhote *et al.* (2011) avaliaram a citotoxicidade induzida pelo veneno de vespa *Polybia paulista* em cultura de células renais, mais especificamente com células do epitélio tubular (MDCK), verificando a perda da viabilidade celular e do aumento da LDH. Nesse sentido, Han *et al.* (2002), ao observarem a citotoxicidade induzida pelo veneno de abelhas (Hymenoptera, Apidae) em cultura de células de túbulo proximal de coelhos, demonstraram a perda da viabilidade celular e o aumento da lactato desidrogenase. Grisoto *et al.* (2006) também demonstraram que após a adição do veneno de abelhas em túbulos proximais isolados de ratos foi observado um aumento significativo na liberação da lactato desidrogenase.

Han *et al.* (2002), além de verificarem que o veneno total de abelha e sua fração melitina aumentaram a absorção de cálcio nos túbulos proximais em culturas de coelho, descobriram que o veneno total de abelha e a fração melitina aumentam a formação de peróxido de lípido quando cultivadas com antioxidantes, pois o peróxido de lípido está relacionado com a perda da viabilidade celular. A fração PLA<sub>2</sub> do veneno está envolvida também com a toxicidade direta do túbulo proximal renal, pois, foi observado uma lesão mediante a hipóxia. Esses resultados sugerem que exista uma correlação estreita entre as frações melitina, PLA<sub>2</sub> e a ativação do canal de Ca<sup>2+</sup>, pois a correlação dos mesmos induziram lesão celular renal (HAN *et al.*, 2002)

Logo, as mortes celulares por necrose observadas nestes resultados, provavelmente, se dão pela presença das duas principais frações (PLA<sub>2</sub> e melitina) presentes na composição do veneno de abelha. Contribui para esses achados, a presença de extravasamento de proteínas, observada na histologia resultante de uma desestabilização da membrana basal glomerular.

Devido ter sido observado alterações vasculares renais com o veneno de *Apis mellifera*, foram feitos estudos com anel de aorta que comprovaram a participação

vascular no mecanismo de aumento da pressão de perfusão e da resistência vascular renal.

Os experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta mantidos sob tensão basal. Dessa forma, o efeito vasoconstritor do veneno total e das frações complexadas (PLA<sub>2</sub> + melitina) foi confirmado. As frações fosfolipase A<sub>2</sub> e melitina isoladas não apresentaram efeito contrátil em anéis de aorta. No entanto não foram observadas alterações nas análises histológicas realizada no presente trabalho.

A alteração na concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup>, frente a estímulos, constitui o mecanismo básico de regulação do estado contrátil do músculo liso. A concentração citoplasmática de cálcio necessária para o processo contrátil é finamente ajustada por canais iônicos, bombas, compartimentos e tampões intracelulares. Dessa forma, um aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> resulta em contração do músculo liso (FADZEAN; GIBSON, 2002).

Na maioria dos casos, a contração do músculo liso envolve uma combinação de entrada e liberação de cálcio. Os vários tipos de músculo liso podem diferir marcadamente a esse respeito: (1) na contribuição relativa das duas fontes de cálcio para a contração e (2) nos canais iônicos através dos quais o cálcio extracelular pode ter acesso ao interior da célula (FADZEAN; GIBSON, 2002).

Na contração do tecido muscular liso vascular, vários mecanismos estão envolvidos, já que células musculares lisas podem se contrair tanto de uma forma direta, como indireta. De uma forma direta, as células se contraem através de seus receptores específicos para neurotransmissores; e de uma forma indireta, a contração acontece através da liberação de substâncias derivadas do endotélio (COELHO *et al.*, 2002). Esse mecanismo de contração decorre do influxo de cálcio na membrana e da liberação dos estoques intracelulares presentes dentro do retículo sarcoplasmático, que têm papel fundamental na contração vascular (JACKSON, 2000).

Segundo Constanzo (2004), a contração do músculo liso ocorre principalmente pelo influxo de íon de cálcio para a célula muscular e, quando a concentração desse íon no líquido extracelular é reduzida, a contração do músculo liso é praticamente abolida.

Após a ativação de receptores específicos, substâncias neurotransmissoras excitatórias promovem influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais na membrana, aumentando seus níveis intracelulares iônicos para induzir eventos celulares e desenvolver a força no músculo liso vascular (JACKSON, 2000).

No presente estudo, observou-se que em meio sem a presença de cálcio, a resposta contrátil do veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) foi inibida. Da mesma forma, com o uso do verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio operado por voltagem, o efeito inibitório permaneceu. Sendo assim, o mecanismo subjacente proposto para o efeito contrátil do VAM envolve a abertura de canais de cálcio operados por voltagem.

As proteínas Gs intermediam a transmissão do sinal entre os receptores acoplados e seus efetores múltiplos, tais como enzimas e canais iônicos. Dentre os receptores presentes no mecanismo de contração do tecido vascular, os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos são alvos das proteínas G, principalmente com ação na enzima fosfolipase C, enzima essa que participa da formação de segundos mensageiros, tais como, trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (BOLTON *et al.*, 1999).

Os mecanismos farmacomecânicos para a contração após interação da célula muscular lisa com um agonista excitatório incluem: (1) Agonistas ligam-se a receptores acoplados à proteína G heterotrimérica, estimulando a atividade de fosfolipase C (PLC). Essa enzima é específica para o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), catalisando a formação de dois potentes segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e o diacilglicerol (DAG); (2) migração do  $\text{IP}_3$  a partir da membrana e interação com um receptor específico situado do retículo sarcoplasmático, permitindo a liberação de cálcio a partir desse estoque intracelular; (3) O DAG, junto com o cálcio, ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas-alvo específicas (AKATA, 2007).

A concentração intracelular elevada de cálcio se liga à proteína calmodulina (CaM), formando o chamado complexo cálcio-calmodulina ( $4\text{Ca}^{2+} \pm \text{CaM}$ ) ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK, do inglês myosin light chain kinase). A MLCK, por sua vez fosforila a cadeia leve de 20 kDa da miosina (MLC, do inglês myosin light chain) permitindo a interação entre actina e miosina (WEBB, 2003). Isso significa que o cálcio não ativa diretamente as proteínas contráteis do músculo liso. Ao invés disso, a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) de 20-kDa serve como mecanismo ativador da atividade de ATPase que promove interação actina-miosina, aumentando assim o número de ciclos de pontes cruzadas e permitindo a contração muscular (BARANY, 1996; SOMLYO *et al*, 1999) (Figura 61 – Anexo 3).

Na tentativa de elucidar a via envolvida pela contração da aorta, foi utilizado um bloqueador dos receptores alfa adrenérgicos (fentolamina) e um inibidor da fosfolipase C (U-73122). Pôde-se observar uma redução significativa no efeito contrátil do veneno total em anel de aorta, sugerindo a participação desses receptores na contração do tecido via enzima fosfolipase C.

Vinhote *et al.*, (2011) observaram alterações vasculares em anéis de aorta induzida pelo veneno de vespa *Polybia paulista*, verificando também que a contração da aorta depende da participação dos canais de cálcio operados por voltagem e que a contração da aorta está envolvida com a participação dos receptores alfa adrenérgicos.

Alvaro *et al.*, (2007), estudando os efeitos das toxinas presente no extrato da *Millepora complanata*, uma espécie de cnidário marino residentes em corais, também constatou efeito vasoconstrictor em anéis de aorta de ratos.

Esse achado corrobora com os resultados na aorta isolada encontrados em rim isolado de rato, verificando-se um aumento da pressão de perfusão renal devido a uma possível vasoconstricção dos vasos que irrigam o rim.

Logo, os dados desse estudo confirmam os resultados de vários trabalhos com veneno de abelha e dos seus principais componentes que apresentam efeito marcado sobre o sistema vascular.

Vale destacar que no presente estudo foi realizado apenas um screen “*in vivo*” do modelo de pressão arterial média (Anexo 4), pois os nossos traçados de pressão arterial não apresentaram resultados satisfatórios, já que além de ter sido feitos ensaios com um  $n < 6$  e somente um ter mostrado um bom resultado, não tínhamos mais veneno para prosseguir os experimentos. Entretanto, há uma grande quantidade de relatos na literatura que avaliam a pressão sanguínea arterial, conforme podemos verificar nos parágrafos seguintes.

Sendo assim, diante de todo o exposto, os resultados experimentais encontrados demonstraram que os principais componentes do veneno de abelha têm efeito sobre o sistema vascular e renal.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*O que não for bom para a colmeia também não é bom para a abelha.*

*Barão de Montesquieu*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nos resultados com a infusão do veneno de *Apis mellifera* em rim isolado, foram observados aumentos da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário.
- O aumento da pressão de perfusão renal demonstrou ter um caráter vascular, uma vez que a elevação desse parâmetro é acompanhada do aumento da resistência vascular renal.
- Em relação à excreção de eletrólitos, pode-se observar uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, sugerindo que a toxina da abelha *Apis mellifera* exerça injúria sobre os túbulos renais, comprovado pela histologia dos túbulos renais.
- As principais estruturas renais afetadas pelo veneno total e frações de *Apis mellifera* foram os túbulos renais e os glomérulos, provavelmente por ação direta do veneno nessas estruturas.
- Além da possibilidade de dano direto às estruturas renais, o aumento da pressão de perfusão renal contribui para uma ampliação dos danos aos tecidos renais, uma vez que estudos *in vitro* podem apresentar injúria tecidual.
- Os experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta quando expostos ao veneno total e as frações complexadas (PLA<sub>2</sub> + melitina). As frações fosfolipase A<sub>2</sub> e melitina isoladas não apresentaram efeito contrátil em anéis de aorta.
- Pôde-se observar que a contração da aorta acontece com a participação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C.

- Os dados desse estudo estão de acordo com os resultados de vários trabalhos com veneno de abelha e dos seus principais componentes que apresentam efeito marcante sobre o sistema vascular.

# CONCLUSÃO

*Ajuda-me, para que eu possa ajudar-te, para que juntos possamos subir a  
montanha.*

*Provérbio Grego*

## 7 CONCLUSÃO

Os parâmetros renais estudados demonstraram alterações vasculares renais quando expostos ao veneno total e às principais frações de *Apis mellifera*. O veneno bruto e frações dessa espécie agem de forma regular, com potente natriurese e diurese pressórica, levando a uma redução significativa no percentual de transporte tubular de eletrólitos, sugerindo que a toxina da abelha exerça injúria sobre os túbulos renais.

O veneno de *Apis mellifera* demonstrou ser nefrotóxico, apresentando possíveis efeitos deletérios diretos e/ou indiretos nos túbulos renais, como demonstrados pelos parâmetros histológicos do tecido renal e reforçados pelos ensaios com células MDCK. Sua atividade vasoconstrictora, associada com seu efeito direto sobre os túbulos renais podem ser características do envenenamento causado pela abelha *Apis mellifera*. Essas manifestações, quando associadas, podem ser responsáveis por uma possível insuficiência renal aguda.

Nossos experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta. O mecanismo subjacente proposto para o efeito contrátil do veneno de abelha envolve a abertura de canais operados por voltagem e a participação dos receptores alfa adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C.

Finalizando, os estudos do veneno e suas frações em diferentes sistemas propiciam um maior conhecimento da fisiopatologia e uma elucidação dos mecanismos observados. Desta forma, pode levar à descoberta e bioprospecção de ferramentas farmacológicas em componentes presentes no veneno.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*Quem voltando a fazer o caminho velho aprende o novo, pode considerar-se um*

*mestre*

*Confúcio*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.** v.21, p.220-231, 2007.

ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F.; KERNTOPF, C.M.; LESSA, R.D.; SOUSA, C.M.; MARTINS, R.D.; SOUSA, D.F.; QUEIROZ, M.G.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v.46, p.271-276, 2005.

ALMEIDA, R. A. M. B.; OLIVO, T. E. T.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; SOUZA, L. R.; MARTINS, J. G.; HASHIMOTO, M.; FABRIS, V. E.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARREVIERA, B. Africanized honeybee stings: how to treat them. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(6): 755-761, Nov-dez, 2011.

ANTONICELLI, L.; BILO, M. B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** v.2, p.341-346, 2002.

AWE, S. O.; ADEAGBO, S. O. Vascular  $\alpha$ 1-adrenoreceptors in isolated perfused rat kidney: influence of ageing. **Autonomic e Autacoig Pharmacology**, 27:19-26, 2007.

AZEVEDO, R. V.; PAIVA, R. B.; ADES, FELIPE.; DAVID, C. M. Poisoning Syndrome due to 2.000 stings of Africanized honeybees. **RBTI**, v. 18, n. 1, 2006.

BARANY, M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. San Diego, **CA: Academic**, 1996.

BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. **Ed. EPUC**, Rio de Janeiro, 1994.

BARRAVIERA, B. Acidentes por abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: **Ed. De Publicações Científicas**, p. 339-344, 1994.

BIOLOGIA E SAÚDE. Guia do estudante. Editora Abril. Disponível em:<

[http://www.guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia\\_4333039.shtm](http://www.guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia_4333039.shtm)> Acesso em: 17 Out. 2009.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n.3, 2002.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. SVS/MS, ano 9, nº 1, 2009.

BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, 61:85-115, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo. Brasil registra 90 mil casos de intoxicação. 2005. Disponível em:<  
<http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=112>> Acesso em: 04 Out. 2007.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. – Brasília, 2001.

BHOGAL, N.; BALLS, M. Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v.5, n.3, p.250-62, 2008.

BUCHMANN, S. L.; G. P. NABHAN. The Forgotten Pollinators. **Washington**, Island, 1996.

CAMARGO, J.M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo: Ceres, 252 p, 1972.

CHAPMAN, E.F. The insects: structure and function. **Cambridge University Press**, New York, 4 ed , p.918, 1998.

CHI, J. Y. Estudo da imunidade adquirida a veneno de abelha (*Apis mellifera*) em apicultores. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo**. São Paulo, 1995.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C. Glândulas exócrinas das abelhas. **Editora FUNPEC**, Ribeirão Preto, 181 p, 2002.

DADE, H.A. Anatomy and dissection of the honeybee. Oxford: International Bee Research Association, 1994. 158p. DE JONG, D. O comportamento das abelhas africanizadas nas Américas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1, 1994, Ribeirão Preto. **Anais... Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo**,p.80-87, 1994.

DAHER, E. F.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, L. S. V.; SILVA, E. M. B.; MORAIS, T. P. Acute renal failure following bee stings. **Case reports**, 42(2):209-212, 2009.

DE MELLO, M. H.; DA SILVA, E. A.; NATAL, D. Africanized bees in a metropolitan area of Brazil: Shelters and climatic influences. **Rev Saude Publica**, 37:237-41, 2003

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia Renal de Vander**. Editora Artmed. Porto Alegre, 6 ed, 2008.

ESHER, S. H. G.; CASTRO, A. P. B. M.; CROCE, J.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. F. M.; KALLI, J. E.; CASTRO, F. F. M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.** Saint Louis, v. 107, n.2, p.375, 2001.

FREE, J.B. A organização social das abelhas (Apis) . **EDUSP-SP**, p79, 1980.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.** 24: 163-169, 1965;

FERREIRA, D. B.; CODTA, R. S.; OLIVEIRA, J. A. M. D.; MUCCILLO, G. An infarct-like myocardial lesion experimentally induced in Wistar rats with Africanized bee venom. **J. pathol**, v. 177, n.1, p. 95-102, 1995.

FIGHERA, R.; SOUZA, T.; BARROS, C. Acidente provocado por picada de abelhas como causa de morte em cães. **Ciência Rural**, 37:590-593, 2007.

FRANÇA, F. O.; BENVENUTI, L. A.; FAN, H.W.; Dos SANTOS, D.R.; HAIR, S.H.; PICCHI-MARTINS, F.R.; CARDOSO, J.L.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Severe and fatal mass attacks by "killer" bees (Africanized honey bees – *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **Q.J.Med.** 87, 269-282, 1994.

FREITAS, G. C. C.; OLIVEIRA, A. E.; FARIAS, J. E. B.; VASCONCELOS, S. D. Acidentes por aranhas, insetos e centopéias registrados no centro de assistência toxicológica de Pernambuco (1993 a 2003). **Rev. Patol. Trop.**, v. 35, p.148-156, 2006.

FONTELES, M. C. COHEN, J.J., BLACK, A.J.; WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** v. 244, p.235-246, 1983.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera stings. **Clin. Tech Small Anim Pract.** v. 21 (4), p. 194-204, 2006.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Acidentes por himenópteros. 2005. Disponível em: < <http://www.funasa.gov.br/start.htm?sid=112> > Acesso em: 17 Out. 2009.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Helth. **Cad. Saúde Públ.** 11: 495-500, 1995.

GARCIA, F. R. M. Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas. **Porto Alegre: Rígel**, 1999.

GRIESBACKER, T.; ALTHUBER, P.; ZENZ, M.; RAINER, L.; GRIENGL, S.; LEMBECK, F. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur. J. Pharmacol.** v. 351, p. 95-104, 1998.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. R.; CASTRO, L.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, 48, 44-54, 2006.

GUIDO, RAFAEL V. C.; ANDRICOPULO, ADRIANO D.; OLIVA, GLAUCIUS. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av. [online]**. v.24, n.70, p. 81-98, 2010.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**. v. 51, p. 211-223, 1989.

HABERMANNE. Bee and wasp venoms. **Science**. v. 177, p. 314-322, 1972.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. S. Citrat, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid Res**. v.9, p.667-668, 1968.

HARVES, A.D.; MILLIKAN, L.E.; Current concepts of therapy and pathophysiology in arthropod bites and stings Part 2. **Insects Int J Dermatol**. V.14,p.621-34, 1975.

HERMAN, H.R. Social Insects. vol. I, II, III. **Academic Press**. USA, 1982.

HUNT, J. H.; BAKER, I.; BAKER, H. G. Similarity of amino acids in nectar and larval saliva: the nutritional basis for trophallaxis in social wasps. **Evolution**. v. 36, p.1318-1322, 1982.

JAISON, P. Social Insects in the Tropics. **Université Paris - Nord**. France, 1982.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**. v. 35, p. 173-178, 2000.

LALLEMENT, G.; FOSBRAEY, P.; BAILLE, LE CROW, V.; TATTERSALL, J. E. H.; BLANCHET, G.; WETHERELL, J. R.; RICE, P.; PASSINGHAM, S. L.; SENTENAC-ROUMANOU, H. Compared toxicity of the potassium channel blockers, apamin and dendrotoxin. **Toxicology**, v.104, n.1-3, p. 47-52, 1995.

LIMA, M. A. P.; de LIMA, J. R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sócias (HYMENOPTERA, VESPIDAE) no Campus da UFJF, Juiz de Fora. **Rev. Bras. Zociêntr.**, v. 2, n. 1, 2000.

LIU, S.; WANG, F.; TANG, L.; GUI, W.; CAO, P.; LIU, X.; POON, A. P.; SHAW, P.; JIANG, T. Crystal structure of mastoparan from *Polistes jadwagae* at 1.2 Å resolution. **Journal of Structural Biology**. v. 160, Issue 1, p. 28-34, 2007.

LEÃO, R. N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. **Instituto Evandro Chagas. UEPA**, p. 785-797; 1997.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potencial of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 2, n. 10, p.790-802, 2003.

MARSH, N. A.; WHALER, B. C. The effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom and two of its constituents, melittin and phospholipase A<sub>2</sub>, on the cardiovascular system of the rat. **Toxicon**, v. 18, p. 427-435, 1980.

MEBS, D. Venomous and Poisonous Animals: a Handbook for Biologists, Toxixologists, Physicians and Pharmacists. **Ed. CRC Pres**, 2002.

MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**. v.26, p.23-32, 2006.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; Dos SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, p. 171-183, 2007.

MELLO, M. H. S. H.; SILVA, E. A.; NATAL, D. Africanized bees in a metropolitan área of Brazil: shelters and climatic influences. **Rev. Saúde Pública**. 37 (2):237-41, 2003.

MEYER, C.R.; WIESE, H. Breves noções de morfologia e anatomia da abelhas. In: WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre: Ed. Agropecuária, p.51-70, 1985.

MCGREGOR, D. D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol**. v.177, p.21-30, 1965.

MÜLLER, U.; MOSBECH, H.; BLAAUW, P. ET AL. Emergency treatment of allergic reactions to Hymenoptera stings. **Clin. Exp. Allergy**, v. 21, p. 281-288, 1991.

NABIL, Z. I.; HUSSEIN, A. A.; ZALAT, S. M.; RAKHA, M. K. Mechanism of action of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom on different types of muscles. **Human & Experimental Toxicology**. V. 17, p. 185-190, 1998.

NAKAJIMA, T. Biochemistry of vespid venom. In: Insect and Arthropod Venoms. **Ed. Tu AT. Marcel Dekker: New York**, p.110-133, 1984.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Apicultura: manejo e produtos. **Jaboticabal: FUNEP**, 191p, 2002.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: Camargo, J. M. F. (org.): **Manual de Apicultura**. São Paulo, Ceres. pp.17-32, 1972.

OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Acidente humano por picadas de abelhas africanizadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33: 403-405, 2000.

OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Human accident for stings of Africanized bee. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33(4):403-405, 2000.

O'NEILL, K. M. Solitary wasps: behavior and natural history. **Comstock. Publishing Associates, USA**, 2001.

OWNBY, C. L.; POWEL, J. R.; FLETCHER, J. E. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**. V. 35, p. 67-80, 1997.

PALMA, M. S.; YAMAME, T.; CAMARGO, A. C. M. Biodiversidade: preservação e bioprospeção. Disponível em:<http://Comciencia.br/reportagem/biodiversidade/bio13.htm>. Acesso em 20 Maio de 2012.

PEDRO, E. Alergia e Insectos. Disponível em:<  
<http://www.medicoassistente.com/modules/smartsection/item.php?itemid=15>>  
Acesso em: 12 mar. 2012.

PEIXOTO, E. B. M. I. Modulação in vitro da função da barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK. **Dissertação (mestrado)** Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 100f, 2003.

PEREIRA, V. S.; SANTOS, G. M. M.. Diversity in Bee (Hymenoptera: Apoidea) and Social Wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae) Community in “Campos Rupestres”, Bahia, Brazil. **Neotropical Entomology**. v. 35 (2), p.165-174, 2006.

PENTEADO, J. O. P.; OLIVEIRA, C. H.; D'ANGIERI, A.; GRAUDENZ, G. S.; MASSUCATO, A. E.; CASTRO, A. B.; CASTRO, E. 3200 picadas de abelhas africanizadas. **RBTI**, v. 15, n. 4, 2003.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**, v. 29, p.139-149, 1991.

SANTOS, G. M. M. Comunidades de vespas sociais (Hymenoptera – Polistinae) em três ecossistemas do estado da Bahia, com ênfase na estrutura da guilda de vespas visitantes de flores de caatinga. **Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo**, 2000.

SCHRIER, W. R.; WANG, W.; POOLO, BRIAN.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J. Clin. Invest.** v. 114, p.5-14, 2004.

SCHMIDT, J. O. Allergy to Hymenoptera venoms In: PIEK, T. Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects. **London Academic Press**, p. 509-546, 1986.

SCHWINN, D.A.; PRICE, D.T.; NARAYAN, P.  $\alpha$ 1-Adrenoreceptor subtype selectivity and lower urinary tract symptoms. **Mayo Clin Proc.** 79(11), 1423-34, 2004.

SCHUMACHER, M, J.; EGEN, N. B. Significance of Africanized bees for health. **Arch Intern Med**, 155: 2038-43, 1995.

SERT, M.; TETIKER, T.; PAYDAS, S. Rhabdomyolysis and acute renal failure due to honeybee stings as an uncommon cause (letter). **Nephron**, 65:647, 1993.

SILVA, E. C. Caracterização de toxinas presentes em peçonhas de vespas. 2003. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas**, 2003.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação – **Depósito Legal na Biblioteca Nacional**. Belo Horizonte, 1ª edição, 2002.

SOARES, A. M. Toxinologia e Biossegurança. **Aplicações Biotecnológicas de Toxinas Naturais e Modelos Sintéticos**. 2005. Disponível em: <<http://sistemas.usp.br:8080/fenixweb/fexDisciplina?sgldis=6045824>>. Acesso em: 19 fev. 2007;

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v.134, p.201-234, 1999.

SOUSA, D. F. Estudos das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi*. Tese de Doutorado, 2010.

SPRADBERY, J. P. WASPS – An Account of the Biology and natural History of Solitary and Social wasps. **London: (s.n)**, 1973.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SHUWARTZ, R. A. Insect Sting reactions to bees, wasp and ants. **Int. J. Dermatol.**, v. 44, p.91-94, 2005.

STRASSER, R. H. IHL-VAL, R., MARQUETANT, R. Molecular Review: Molecular biology of adrenergic receptors. **J. Of. Hypert**, 10:501-506, 1992.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. v.27, p.201-206, 2003.

WILSON, E. O. the insects and man. *In*: SAIDEMBERG, N. B. B. Efeito das Interações Peptídeo-Peptídeo e peptídeo-membrana nas Atividades Funcionais de Toxinas peptídicas do Veneno da Vespa Social *Agelais pallipes pallipes*

(Hymenoptera, Vespidae). **Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2007.**

YU, L.; SANTOS, B. F.; BURDMANN, E. A.; SUASSUNA, J. H. R.; BATISTA, P. B. P. Insuficiência renal aguda. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de nefrologia/Comitê de Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007.**

YU, Y.; DEWECK, A. L.; STADLER, B. M.; MÜLLER, U. Anti-IgE autoantibodies and bee-sting allergy. **Allergy**, v. 50, n. 2, p. 119-125, 1995.

TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; BERGER, M.; DE OLIVEIRA, S.K.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; GUIMARÃES, J.A. Melittin-induced platelet signaling and aggregation. **Biochemical and Biophysics Research Communications**. 2006.

THIRUVENTHIRAN, T.; GOH, B. L.; LEONG, C. L.; CHEOH, P. L.; LOOI, L. M.; TAN, S. Y. Acute renal failure following multiple wasp stings. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 14, p. 214-217, 1999.

VANHOLDER, R.; SEVER, M. S.; EREK, E.; LAMEIRE, N. Rhabdomyolysis. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 11, p. 1553-1561, 2000.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. Tityus serrulatus hypotensis: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.371, p.515-550, 2008.

VINHOTE, J.F.C.; TORRES, A.F.C.; DANTAS, R.T.; PRACIANO, T.P.; MENEZES, R.R.P.P.B.; SOUSA, D.F.; BRITO, T.S.; LIMA, F.J.B.; TOYAMA, M.H.; MAGALHÃES, P.J.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS-NUNES, A.M.C. Renal and calcium-dependent vascular effects of Polybia paulista wasp venom. **Jvat**. v.17, p.199-208, 2011.

VOGT, W.; PATZOR, P.; LEDE, L.; OLDIGS, H.D.; WILLIE, G. Synergism between phospholipase A2 and various peptides and reagents in causing haemolysis. **Naunyn Schmiedebergs Arch pharmacol**. v.264,p.442-7, 1970.

# ANEXOS

*Um sonho sonhado só é apenas um sonho, Um sonho sonhado junto é realidade.*

*Raul Seixas*

## ANEXO 1

### Chromatographic analyses of the bee venom

The purification of the bee venom sPLA2 was conducted in two chromatographic steps of the reversed-phase HPLC. Previously, the honey bee whole venom was dissolved in saline 0.9% at a concentration of 10 mg / mL in a final volume of 20 ml, which it was kept on constant shaking at 14 ° C and then the proteins contained in the venom was precipitated with a pure acetone for 24 hours to obtain the protein extracta that was then dried and stored for the fractionation of sPLA2, which was happen in two chromatographic steps of reversed-phase HPLC.

In the first step, the venom was fractionated on a molecular exclusion HPLC column, using a Tricon column (1 x 60 cm) previously packed with Superdex 75 resin. The column was attached to the semi-preparative on the reversed-phase HPLC and was equilibrated with 0.2M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 that was pumped to the chromatographic system at a flow rate of 0.6mL / min for 60 minutes. The honey bee venom extract, approximately 15 mg of was dissolved in 250  $\mu$ L of buffer, which was homogenized and centrifuged at 4500xg for 5 minutes and filtered through 0.45 $\mu$ m filter and then applied millex column. Fractionation of the venom was performed at a constant flow of 0.3 mL / min and monitoring the race was held the absorbance of 280 nm and fractions collected in a fraction collector at a rate of 3 minutes per tube, which was submitted to tests to characterize the phospholipase A2 enzyme activity. The samples were characterized by electrophoresis.

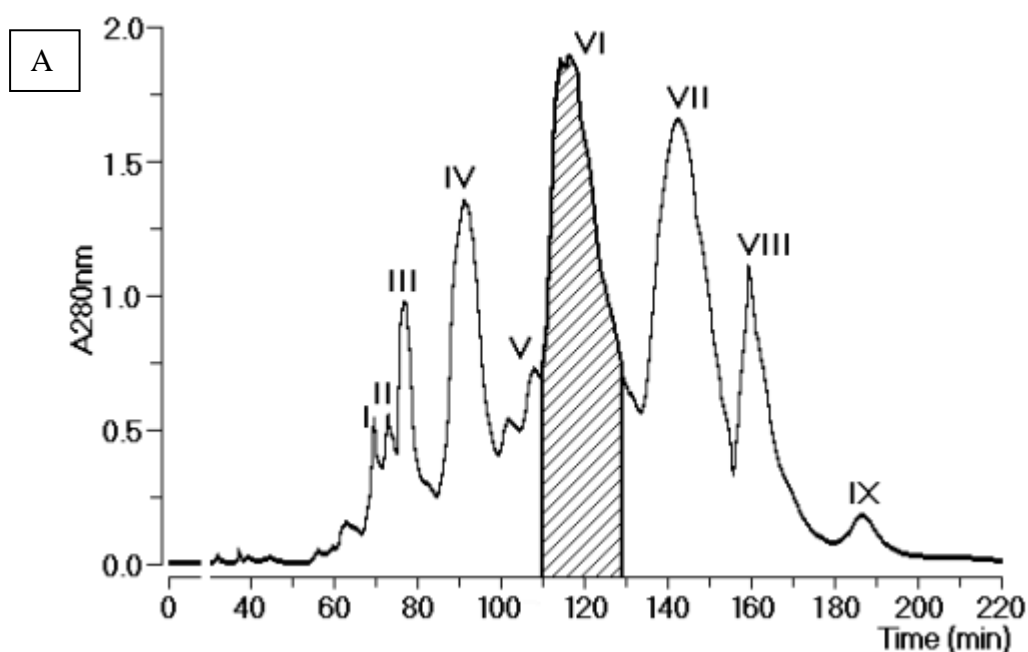
Once confirmed the enzymatic activity of phospholipase A2, this fraction was subjected to a new chromatographic step on the reversed-phase HPLC using a semi analytical column C5. In this step, the purification of sPLA2 was performed on C5 reverse phase column, which was equilibrated with buffer A (0.1% TFA) for 30 minutes at a flow rate of 1 ml / min. Samples of the fraction with phospholipase A2 activity (3 mg) was dissolved in 250 mL of buffer A and clarified and properly applied to the chromatographic column. The elution of sPLA2 was performed with a

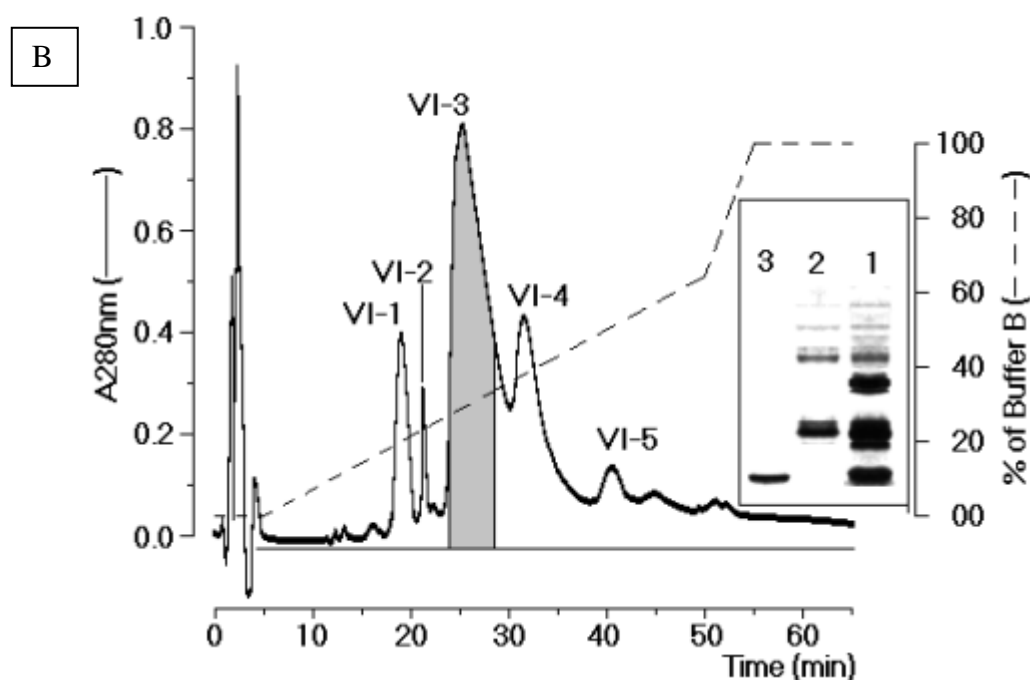
continuous linear gradient of buffer B (66% acetonitrile in 0.1% TFA) and monitoring of the chromatographic profile was 280nm. The samples were characterized by electrophoresis.

## RESULTS

### Chromatographic analyses of VAM

The figure 62, showed the fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone. The chromatographic profile presented in the figure 1.A showed the presence of 9 main fractions where the phospholipase A2 activity was found only in the fraction designated as VI. This fraction was subjected to a new chromatographic step in the reverse phase HPLC that was fractionated in five main fractions designated as VI-1 - VI-5 and only fraction VI-3 presented a phospholipase A2 enzymatic activity. The SDS-PAGE of this fraction showed a molecular mass of 15 kDa approximately (Figure 1.B).





**Figure 62:** **A:** Fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone. Shows the profile of the chromatographic fractionation of the extract of bee venom total molecular exclusion column using packed with Superdex75. The chromatographic run was carried out using a flow finds 0.6 mL/h and was monitoring the chromatographic run was carried out A280nm **B:** New chromatographic step in the reverse phase HPLC that was fractionated in five main fractions designated as VI-1 - VI-5. We see the results of fractionation of the enzyme fraction mind (PLA2) active in an ion exchange column. We observed the PAGE-SDS electrophoretic run of the purified proteins. Fractions VI-3 was confirmed as sPLA2 by specific phospholipase A2 assay and other fractions was recovered and its molecular mass was characterized by MALDI TOF.

## Mass spectrometry

The molecular mass of sPLA2 and melittin were determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Voyager-DE PROMALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). One microliter of samples in 0,1% TFA was mixed with 2 $\mu$ L of the matrix was  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, and 0,1 % TFA (v/v). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0,1% TFA (v/v). Ion masses were determined with an acceleration voltage of 25 kv, the laser operated at 2890  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>, a 300-ns delay, and the linear analysis mode.

**ANEXO 2**

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

**DECLARAÇÃO**

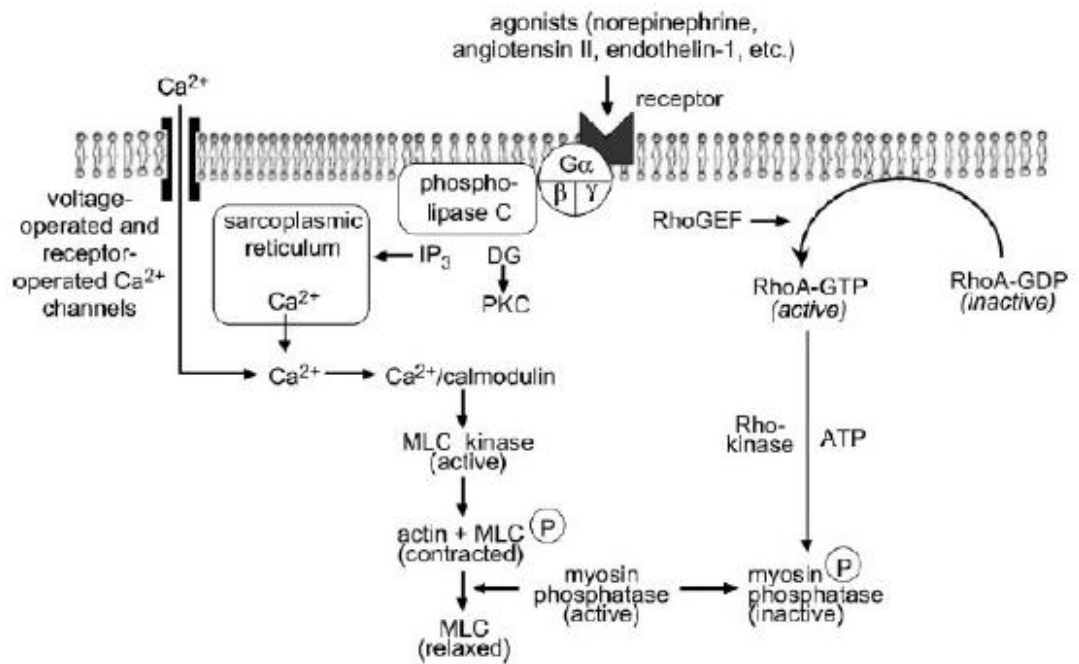
Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 01/2012, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E VASCULARES INDUZIDOS PELO VENENO E FRAÇÕES ISOLADAS DE ABELHA DA ESPÉCIE APIS MELLIFERA”**, de responsabilidade de Helena Serra Azul Monteiro e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 14 de maio de 2012.

Fortaleza, 29 de maio de 2012

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

## ANEXO 3



**Figura 63. Mecanismos celulares envolvido na contração.** (Fonte: Webb, 2003).

## **ANEXO 4**

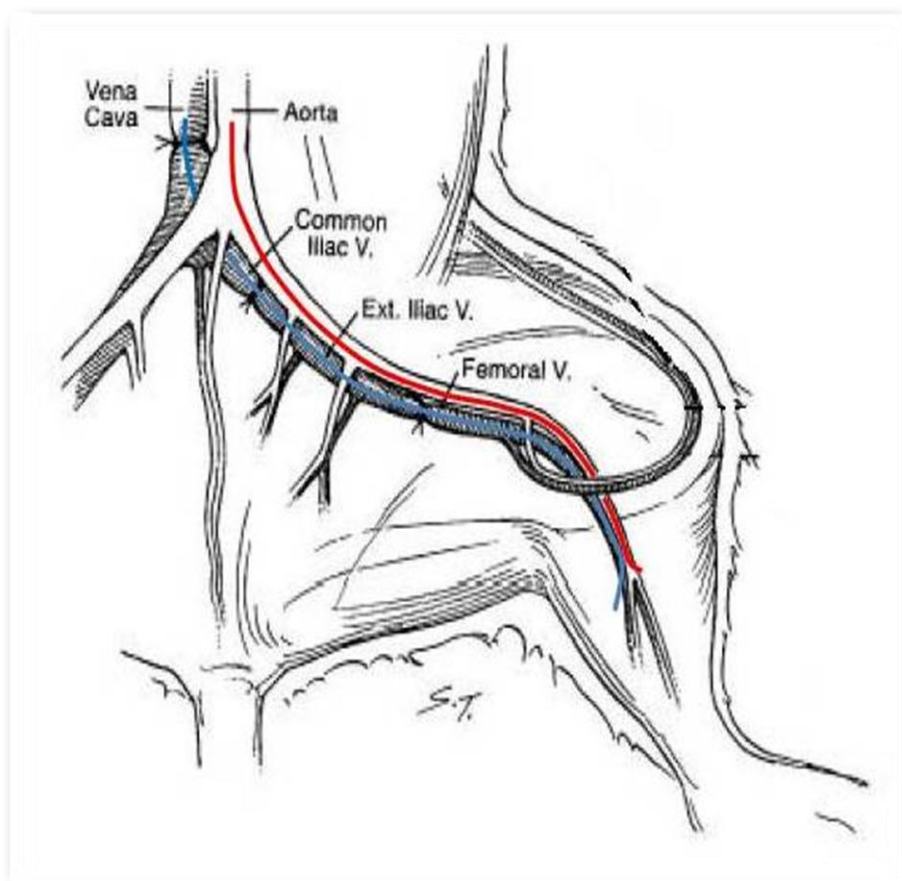
Conforme destacado na discussão dos resultados, segue a metodologia e o resultado do screen da pressão arterial média.

### **EFEITOS NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DE RATOS ANESTESIADOS**

#### **METODOLOGIA**

##### **Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) e mantidos em decúbito dorsal. A traquéia foi isolada e uma curta cânula de polietileno (PE120) foi inserida nos animais por meio de traqueostomia, permitindo um fluxo respiratório espontâneo e a fácil aspiração de eventuais secreções brônquicas (Figura 64).



**Figura 64. Localização anatômica da artéria e veia femoral e posicionamento dos cateteres arterial (vermelho) e venoso (azul).**

Após a traqueostomia, dois cateteres de polietileno (PE10 conectado a PE50) pré-enchidos com heparina ( $500 \text{ UI.mL}^{-1}$  em salina isotônica) foram implantados na aorta abdominal para registro da pressão arterial média (P.A.M), frequência cardíaca(F.C) e eletrocardiograma(ECG). Na veia cava inferior (para administração de drogas), ambos 1 cm abaixo da artéria renal, conforme técnica descrita previamente (Lahlou *et al.*, 1999 apud SIQUEIRA, 2005).

## Sistema de aquisição de dados

No momento do experimento, o cateter aórtico foi acoplado a um transdutor de pressão piezo-elétrico (Braile BXS<sub>N</sub>) acoplado ao sistema de amplificação de sinal com interface USB (DATAQ DI-148U) e utilizando o software de aquisição de dados WinDaq/Lite. A P.A.M, ECG e a F.C. foram diretamente calculadas pelo software.

## Procedimento experimental

A administração intravenosa do veneno de *Apis mellifera* foi sempre efetuada após um período de estabilização da P.A.M., ECG e da F.C. Tais parâmetros foram registrados por períodos de 5 a 10 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. Quando foram administradas injeções subsequentes do veneno os valores da P.A.M. foram acompanhados até que retornassem aos seus respectivos níveis de controle (SIQUEIRA, 2005). As doses do veneno foram escolhidas baseadas na literatura e em experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa.

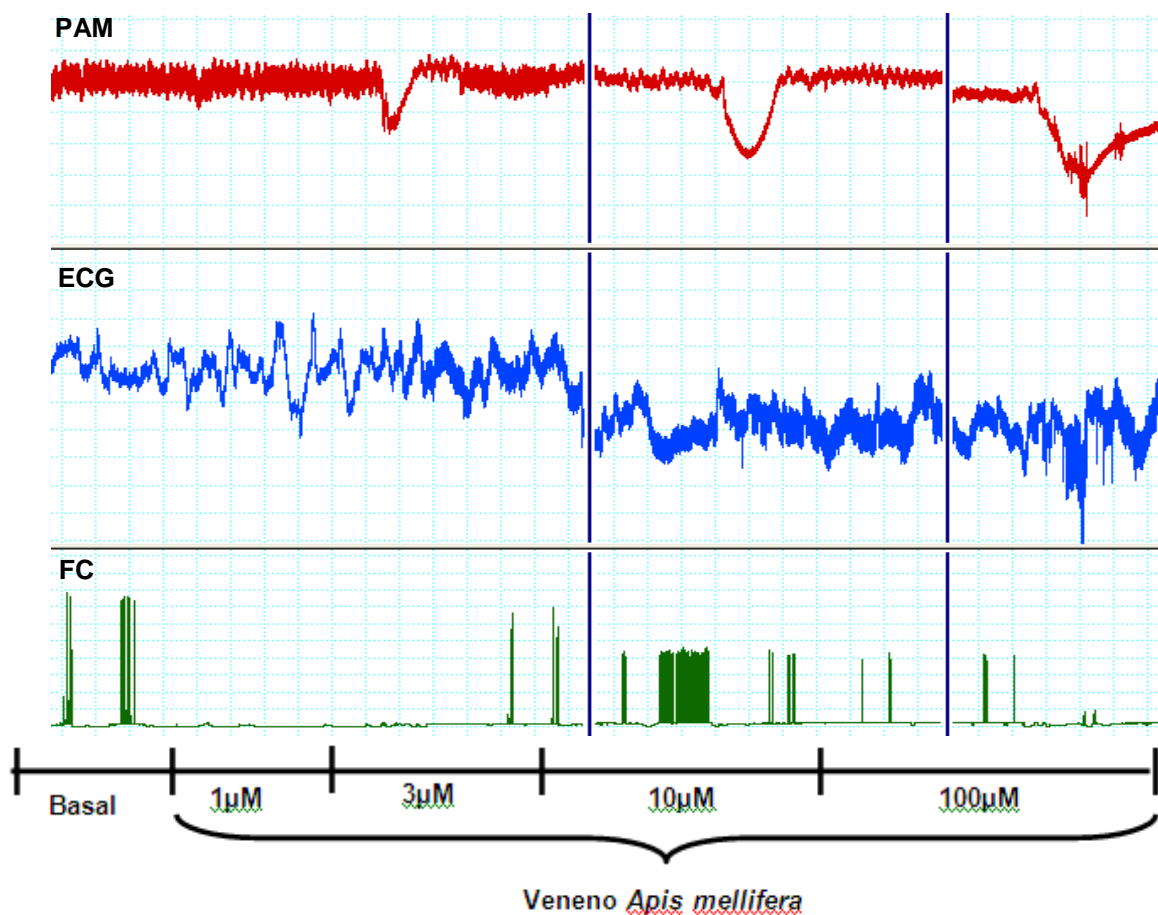
Ao término dos experimentos os animais foram sacrificados por overdose de tiopental sódico por via intravenosa.

## Grupos experimentais

### ❖ Relação dose-efeito

Para estabelecer a relação dose-efeito, os animais receberam doses crescentes, em bolus, do veneno de *Apis mellifera* (1, 3, 10, 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). O curso temporal das variações de pressão arterial média (P.A.M), eletrocardiograma (ECG) e frequência cardíaca (F.C) foi registrado após a administração.

## RESULTADO



**Figura 65.** Traçado do efeito de diferentes concentrações de *Apis mellifera* (1-100µM) na pressão arterial de ratos “in vivo”. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a pressão arterial média (PAM), eletrocardiograma (ECG) e frequência cardíaca (FC).

**ANEXO 5****Trabalhos apresentados em congresso com o tema da tese:**

1. COSTA, P. H. S, SOUSA, P. C. P., SILVA NETO, A.G.D, JORGE, A. R. A, H.S.A.MONTEIRO. ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS DO VENENO TOTAL DE APIS MELLIFERA IN: XXX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2011, FORTALEZA.
2. SOUSA, P. C. P., BRITO, T. S., SILVA NETO, A.G.D, D.F. SOUSA, MARINHO, A. D., MAGALHAES, P. J. C., M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. VASOCONSTRICTOR EFFECTS OF THE VENOM OF APIS MELLIFERA IN ISOLATED RAT AORTA ARE PROMOTED BY ITS FRACTIONS PLA2 AND MELITTIN IN: FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2011, RIO DE JANEIRO.
3. SOUSA, P. C. P., H.S.A. MONTEIRO. VENENO DE ABELHA AFRICANA (APIS MELLIFERA): EFEITOS VASOCONSTRICTOR EM AORTA ISOLADAS DE RATOS. IN: II WORKSHOP NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA, 2011, FORTALEZA.
4. SOUSA, P. C. P., BRITO, T. S., R.M. XIMENES, D.F. SOUSA, MARINHO, A. D., MAGALHAES, P. J. C., M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO.EFEITO VASOCONSTRICTOR DO VENENO DE APIS MELLIFERA EM AORTA ISOLADA DE RATO IN: V REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE 2010), 2010, ARACAJU.
5. SOUSA, P. C. P., FEITOSA, A. C.S, D.F. SOUSA, R.S. ALVES, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. EVALUATION OF EFFECTS OF APIS MELLIFERA BEE VENOM ON ISOLATED RAT KIDNEY IN: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA, 2010, FORTALEZA-CE.

6. SOUSA, P. C. P., FEITOSA, A. C.S, D.F. SOUSA, R.M. XIMENES, R.S. ALVES, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. STUDY OF THE RENAL EFFECTS OF APIS MELLIFERA VENOM IN: XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 2010, ARAXÁ.
  
7. SOUSA, P. C. P., J.F. CHAGAS, A.R.C. JORGE, F.C.M.SOUSA, D.F. SOUSA, R.S. ALVES, J.P.C. BARBOSA, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO, A.M.C. MARTINS. EVALUATION OF EFFECTS FROM POLIBYA PAULISTA WASP VENOM ON ISOLATED RAT KIDNEY IN: XVI WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2009.
  
8. C.A.V.G. LEITE, R.S. ALVES, R.M. XIMENES, A.R.C. JORGE, D.F. SOUSA, MARINHO, D., SOUSA, P. C. P., A.T.B MENDONÇA, DAHER, E., H.S.A. MONTEIRO. FUROSEMIDE EFFECTS ON ISOLATED PERFUSED RAT KIDNEY: A PRELIMINARY STUDY IN: 41º CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL - BRADICININA 60 ANOS, 2009, RIBEIRÃO PRETO.



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Biotecnologia em Saúde

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE ABELHA *Apis  
mellifera*

Paulo César Pereira de Sousa

Fortaleza – CE  
2012



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

Paulo César Pereira de Sousa

Fortaleza – CE  
2012

Paulo César Pereira de Sousa

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA  
2012

S698e Sousa, Paulo César Pereira de

Estudo das alterações renais e vasculares induzidas pelo veneno total e frações isoladas *de Apis mellifera* / Paulo César Pereira de Sousa. – 2012.

148 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Toxicologia. 2. Rim. 3. Vasos Sanguíneos. I. Título.

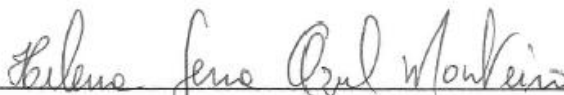
Paulo César Pereira de Sousa

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAS E VASCULARES INDUZIDAS  
PELO VENENO TOTAL E FRAÇÕES ISOLADAS DE  
*Apis mellifera*

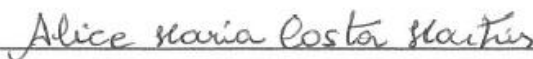
Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do curso de Pós-Graduação de Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Aprovada em: 25/07/2012

BANCA EXAMINADORA



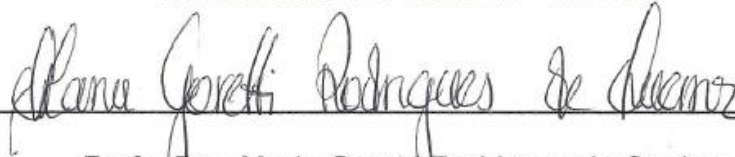
Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC



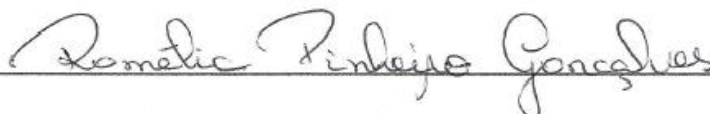
Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR



Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Raimundo e Cândia, que me educaram com valores e princípios de que devemos pautar a vida com amor, paz e respeito ao próximo. A eles agradeço a oportunidade de sempre acreditarem na minha dedicação aos estudos. Obrigado pela torcida incontestável.*

*A minha princesinha, Juliana, que ilumina meus caminhos e está sempre ao meu lado na árdua tarefa de enfrentar a vida. Esta tese tem um pouco de sua personalidade.*

*“...se eu pudesse amar, eu mudava a natureza, acabava com a tristeza, pra nunca mais te ver chorar...teus olhos são a poesia que no dia-a-dia eu guardo pra compor...”*

*Agêpê & Canário*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por que ele é o começo, o meio e o fim de todas as coisas.

Aos meus pais Raimundo Aguiar e Cândida Pereira, por sua compreensão e apoio, mesmo diante da distância.

Aos meus irmãos: Carlos, Socorro, Daniel, Regina, Raimundo Júnior, Cláudio e Fernando, que de alguma forma me ajudaram a conquistar meus objetivos.

Em destaque a minha irmã Regina e ao meu cunhado Tomás, que estiveram ao meu lado no início desta caminhada me dando todo apoio e suporte.

A amada e eterna avô, mesmo distante passava fé e esperança para que pudéssemos acreditar na vida e sermos honesto.

A sempre amável e carinhosa Francisca (titia) e Socorro (bebeca ou viúva).

A minha orientadora, Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelas orientações, paciência e empenho a mim dedicado durante o doutorado. Um exemplo de mulher guerreira, com coração meigo e carinhoso.

A professora Maria Goretti R. de Queiroz, grande incentivadora para que eu segui-se a carreira acadêmica, conterrânea de coração a quem devo as palavras de apoio e crescimento como ser humano e profissional.

Ao professor Dr. Everardo Menezes, obrigado pela recepção no laboratório de microbiologia e por ter me orientado na iniciação científica, devo a você a visão

crítica da pesquisa...você foi responsável por ter aberto as portas da academia.  
Obrigado meu eterno orientador!

Ao professor Alexandre Havt, sempre dedicado e solícito na arte de ensinar,  
obrigado pelos ensinamentos em Biologia Molecular.

A grande amiga Renatinha, pelas ajudas e dedicação no decorrer da vida  
acadêmica. Hoje, professora Dra. Renata Alves.

Obrigado Professor Dr. René Duarte, com suas sátiras inteligentes sempre nos  
ajudou fazer ciência com humor e leveza.

Ao meu grande amigo de graduação e pós-graduação Carlos Filho, que de  
alguma forma me ajudou durante a faculdade.

Professora Alice Martins, obrigado pelas palavras de incentivo.

Aos colegas de pós-graduação do LFAVET: Rafael Jorge, Roberta Jeane,  
Claudênio, Marta, Fabíola Carine, Profa. Alcínia, Profa. Marinetes, Antônio Gomes  
Neto, Diogo Augusto, Pedro e Dalvane.

Aos alunos de IC que conheci no LFAVET, todos eles: Caio Abner, Natasha,  
João Paulo Saraiva, João Victor, Pedro, João Paulo Barbosa, Aline Sampaio,  
Aline Araújo, Marcelo, Paula, foi um prazer conhecê-los.

Obrigado Bia (Beatriz Serra Azul)!

Agradecimento especial para o grande amigo Rafael Ximenes, um caro super  
inteligente e amigo.

Dr. Daniel Freire, amigo e companheiro, obrigado pelo apoio e orientações durante a caminhada do doutorado.

Sílvia Freire e Sr. Bento, obrigado pela dedicação nas determinações bioquímicas e pelos animais utilizados nos experimentos, se não fossem vocês nada disso existiria. Obrigado por todas as horas de dedicação!

Ao grande mestre Professor Dr. Célio, obrigado pelos ensinamentos científicos e éticos.

A farmacêutica e amiga Dra. Adriana Matos, pelos ensinamentos a mim dedicados, os quais me engrandeceram profissionalmente. Em especial a Dra. Socorro Sena pelas orientações em análises clínicas e especial em microbiologia.

Terezinha Brito, Ramon e Ticiano Praciano, obrigado pela parceria nos experimentos de aorta e MDCK. Estarei sempre à disposição.

Aos secretários Karine Ribeiro e Paulo Wanderson do Programa de Pós Graduação da RENORBIO pela colaboração durante a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de auxílio para execução deste projeto.

Agradeço a todos os meus professores e colegas da graduação e pós-graduação, obrigado por tudo!

A quem eu esqueci, peço minhas desculpas, mas todos foram muito importantes para esse trabalho! Obrigado por tudo!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução e conclusão deste trabalho, muito obrigado!

*Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.*

*Paulo Freire*

## RESUMO

O aumento dos acidentes envolvendo abelhas africanizadas no Brasil e em toda a América, nas últimas décadas, passou a ser objeto de vigilância das autoridades sanitárias, devido ao fato dos acidentes com centenas de abelhas estarem associadas a quadros de envenenamento. O veneno da abelha *Apis mellifera* é uma mistura de peptídeos tóxicos com diversas ações locais e sistêmicas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da abelha *A. mellifera* e de suas frações PLA<sub>2</sub> e melitina. Foram utilizados ratos Wistar machos (250-300g), cujos rins foram isolados e perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificado contendo 6g% de albumina bovina previamente dialisada. A avaliação dos efeitos vasculares do veneno de *Apis mellifera* em vasos de condutância foi realizada através dos ensaios em anel de aorta isolado de rato. Os resultados encontrados demonstraram que o veneno total de *A. mellifera* e da fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) promoveram alterações significativas em todos os parâmetros renais estudados, produzindo um aumento na pressão de perfusão renal (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (FU) e no ritmo de filtração glomerular (RFG), todas essas alterações foram verificadas nas concentrações de 3µg/mL e 10µg/mL. Porém, a menor concentração (1µg/mL) não apresentou efeito nos parâmetros avaliados. Foi verificada uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>), sugerindo que o veneno total e a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) exerçam injúria sobre os túbulos renais. Também foram observadas depósito de proteínas nos túbulos renais nas análises histológicas com regiões focais de necrose/apoptose, bem como foi constatada redução da viabilidade das células MDCK e do aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH), cujo efeito citotóxico dependente de concentração com um valor de IC<sub>50</sub> 47.84µg/mL. Nesse sentido, os resultados sugerem que as lesões renais foram por necrose nas condições testadas. Foi demonstrado no protocolo de anel de aorta um aumento na contratilidade. Em conclusão, o veneno total e a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera* causaram nefrotoxicidade, sugestivo de uma ação direta com morte celular em células do túbulo renal por necrose. O efeito contrátil do veneno de abelha envolve a abertura de canais de cálcio operados por voltagem e sugerem a participação dos receptores alfa adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C. Esse achado corrobora com os resultados encontrados em rim isolado de rato, verificando-se um aumento da pressão de perfusão renal devido a uma possível vasoconstrição dos vasos que irrigam o rim. Os estudos do veneno e suas frações em diferentes sistemas propiciam um maior conhecimento da fisiopatologia e uma elucidação dos mecanismos observados. Desta forma, pode levar à descoberta e bioprospecção de ferramentas farmacológicas em componentes presentes no veneno.

**Palavras-chave:** Venenos de abelhas, Rins, Vasos sanguíneos.

## ABSTRACT

The increase in accidents involving Africanized bees in Brazil and throughout Latin America in recent decades has become the object of surveillance by the health authorities, because of accidents with hundreds of bees to be associated with frames of poisoning. The venom of the honeybee *Apis mellifera* is a mixture of toxic peptides with various local and systemic actions. The objective of this study was to evaluate the renal and vascular changes promoted by the whole venom of the bee *A. mellifera* and its fractions PLA<sub>2</sub> and melittin. Male Wistar rats (250-300g) whose kidneys were isolated and perfused with Krebs-Henseleit solution containing modified 6g% bovine albumin previously dialyzed. The evaluation of the vascular effects of the venom of *Apis mellifera* in pots was carried out using conductance tests ring of isolated rat aorta. The results showed that the whole venom of *A. mellifera* and the complexed fraction (PLA<sub>2</sub>+melittin) promoted significant changes in all renal parameters studied, producing an increase in renal perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), urinary flow (FU) and the glomerular filtration rate (GFR), all these changes were seen at concentrations of 3µg/mL and 10µg/mL. However, the lower concentration (1µg/mL) had no effect on the evaluated parameters. It was observed a significant reduction in the percentage of tubular transport of sodium (Na<sup>+</sup>), potassium (K<sup>+</sup>) and chloride (Cl<sup>-</sup>), suggesting that the whole venom and the fraction complexed (PLA<sub>2</sub>+melittin) engaged on the renal tubular injury. Were also observed in protein deposition in the renal tubules histological focal regions with necrosis/apoptosis, and was found reduced the viability of the MDCK cells and an increased of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), whose concentration dependent cytotoxic effect with a value IC<sub>50</sub> 47.84µg/mL. In this sense, the results suggest that the renal lesions were necrosis in the tested conditions. It had been shown in the protocol of aortic ring an increase in contractility. In conclusion, the whole venom and the fraction complexed (PLA<sub>2</sub>+melittin) of bee *Apis mellifera* caused nephrotoxicity, suggesting a direct action on cell death in renal tubule cells by necrosis. The contractile effect of bee venom involves the opening of calcium channels operated by voltage and suggest a role of alpha adrenergic receptors via activation of phospholipase C. This finding confirms the results found in the isolated rat kidney and there was an increase in pressure due to renal perfusão possible vasoconstriction of the vessels supplying the kidney. Studies of the venom and its fractions in different systems provide a greater understanding of the pathophysiology and an elucidation of the mechanisms observed. Thus, it can lead to the discovery of pharmacological tools and bioprospecting in the components present in the venom.

**Key words:** Bee venoms, Kidneys, Blood vessels.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%TCI<sup>-</sup> - percentual de cloreto transportado

%TK<sup>+</sup> - percentual de potássio transportado

%TNa<sup>+</sup> - percentual de sódio transportado

%TpCI<sup>-</sup> - percentual de cloreto proximal transportado

%TpK<sup>+</sup> - percentual de potássio proximal transportado

%TpNa<sup>+</sup> - percentual de sódio proximal transportado

μEq.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - miliequivalente por grama por minuto

® - marca registrada

μg/mL - micrograma por mililitro

A - adenina

AA – Abelha africanizada

Ach - acetilcolina

AT1 – receptor de angiotensina II

BPF – Fator potencializador de bradicinina

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

CaCl<sub>2</sub> - cloreto de cálcio

CA - Califórnia

CE<sub>50</sub> - Concentração necessária para se observar 50% dos efeitos

CEATOX – Centro de Assistência Toxicológica

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

cm<sup>2</sup> - centímetros quadrados

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

ECl<sup>-</sup> - potássio excretado

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

$E_{K^+}$  - potássio excretado

$E_{MAX}$  - efeito máximo

$E_{Na^+}$  - sódio excretado

EPM - erro padrão da média

EUA - Estados Unidos da América

$F_{Cl^-}$  - cloreto filtrado

$F_{K^+}$  - potássio filtrado

$F_{Na^+}$  - sódio filtrado

FPR - fluxo de perfusão renal

FU - fluxo urinário

xG - força da gravidade

gF - grama-força

HE - hematoxilina-eosina

Ig E – Imunoglobulina E

IRA - insuficiência renal aguda

$K^+$  - potássio

KCl - cloreto de potássio

kDa – kilo dalton

$KH_2PO_4$  - fosfato de magnésio dibásico

LCC - Laboratório de cultivo celular

L/h - litros por hora

LFAVET - Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas

LDH - enzima lactato desidrogenase

$MgCl_2$  - cloreto de magnésio

MDCK - *Madin-Darby canine kidney* - células caninas renais de *Madin Darby*

mg - miligrama

mg/Kg - miligrama por kilograma

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - sulfato de magnésio heptahidratado

min - minuto

mL.g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - mililitro por grama por minuto

mL/min - mililitros por minuto

mM - milimolar

mmHg - milímetros de mercúrio

mmHg. mL<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup> - milímetros de mercúrio por mL por grama por minuto

MO - Missouri

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio

n - letra que representa o número da amostra estudada

nm - nanômetros

NaCl - cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de sódio dibásico

NaHCO<sub>3</sub> - bicarbonato de sódio

NO - óxido nítrico

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

p/v - peso por volume

PBS - tampão fosfato - *phosphate buffer solution*

PE-30 - tubo de polietileno número 30

pg - picograma

pH - potencial hidrogeniônico

Posm - osmolaridade do perfusato

PP - pressão de perfusão

PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>

RFG - ritmo de filtração glomerular

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RVR - resistência vascular renal

SBF - soro bovino fetal

TCI<sup>-</sup> - cloreto transportado

TK<sup>+</sup> - potássio transportado

TNa<sup>+</sup> - sódio transportado

UECE - Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UNESP - Universidade Estadual de São Paulo

USP – Universidade de São Paulo

Uosm - osmolaridade urinária

U/L - Unidade internacional por litro

VAM - veneno de *Apis mellifera*

U-73122 – Inibidor de fosfolipase C

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação taxonômica da abelha <i>Apis mellifera</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 2.</b> Aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 3.</b> Fotografia de abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 4.</b> Cabeça da abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 5.</b> Foto de abelha demonstrando os aspectos da anatomia interna de <i>Apis mellifera</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b> Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.....	<b>56</b>
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado .....	<b>57</b>
<b>Figura 8.</b> Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>58</b>
<b>Figura 9.</b> Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema.....	<b>58</b>
<b>Figura 10.</b> Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema.....	<b>59</b>
<b>Figura 11.</b> Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado .....	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b> Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas .....	<b>61</b>
<b>Figura 13.</b> Identificação (A) e canulação (B) do ureter .....	<b>62</b>
<b>Figura 14.</b> Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C). .....	<b>63</b>
<b>Figura 15.</b> Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica .....	<b>63</b>

<b>Figura 16.</b> Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.....	<b>64</b>
<b>Figura 17.</b> Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados .....	<b>67</b>
<b>Figura 18.</b> Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b> Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	<b>72</b>
<b>Figura 20.</b> Visualização do segmento torácico da aorta .....	<b>73</b>
<b>Figura 21.</b> Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado.....	<b>74</b>
<b>Figura 22.</b> Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares .....	<b>74</b>
<b>Figura 23.</b> Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada...	<b>75</b>
<b>Figura 24.</b> Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato.....	<b>75</b>
<b>Figura 25.</b> Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.....	<b>76</b>
<b>Figura 26.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) na pressão de perfusão renal (PP). .....	<b>82</b>
<b>Figura 27.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) na resistência vascular renal (RVR) .....	<b>84</b>
<b>Figura 28.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no fluxo urinário (FU). .....	<b>86</b>
<b>Figura 29.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no ritmo de filtração glomerular (RFG) .....	<b>88</b>
<b>Figura 30.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ).....	<b>90</b>

<b>Figura 31.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) .....	<b>92</b>
<b>Figura 32.</b> Efeitos do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (VAM) no percentual de transporte de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ).....	<b>94</b>
<b>Figura 33.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> na pressão de perfusão renal (PP).....	<b>97</b>
<b>Figura 34.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> na resistência vascular renal (RVR) .....	<b>99</b>
<b>Figura 35.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> no fluxo urinário (FU).....	<b>101</b>
<b>Figura 36.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> no ritmo de filtração glomerular (RFG). .....	<b>103</b>
<b>Figura 37.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de sódio (%TNa <sup>+</sup> ).....	<b>105</b>
<b>Figura 38.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de potássio (%TK <sup>+</sup> ) .....	<b>107</b>
<b>Figura 39.</b> Efeito da fração (PLA <sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de cloreto (%TCl <sup>-</sup> ) .....	<b>109</b>
<b>Figura 40.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais .....	<b>111</b>
<b>Figura 41.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais.....	<b>112</b>
<b>Figura 42.</b> Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos normais.....	<b>113</b>
<b>Figura 43.</b> Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais .....	<b>114</b>

- Figura 44.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (1µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais ..... **115**
- Figura 45.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (3,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais ..... **116**
- Figura 46.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (10,0µg/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais..... **117**
- Figura 47.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno de *Apis mellifera* (3µg/mL) demonstrando túbulos dilatados, depósitos hialinos formando cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular ..... **118**
- Figura 48.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando túbulos dilatados com depósito intertubular, verdadeiros cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular .. **119**
- Figura 49.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de material protéico, indicativos de morte celular..... **120**
- Figura 50.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA2 + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de substância eosinofílica ..... **121**
- Figura 51.** Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL) ..... **123**

<b>Figura 52.</b> Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle .....	<b>125</b>
<b>Figura 53.</b> Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno de <i>Apis mellifera</i> , (50,0 µg/mL), presença de agrupamento celular e citoplasma granuloso e demonstrando o padrão de morte celular observado, onde A representa as células expostas ao VAM.....	<b>126</b>
<b>Figura 54.</b> Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno da abelha <i>Apis mellifera</i> (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).....	<b>127</b>
<b>Figura 55.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca <sup>2+</sup> 1mM e na ausência de Ca <sup>2+</sup> 1mM. ....	<b>130</b>
<b>Figura 56.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem fentolamina e na presença de fentolamina .....	<b>131</b>
<b>Figura 57.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem verapamil e na presença de verapamil.....	<b>132</b>
<b>Figura 58.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem losartanl (●, n=5; 0,1-50µg/mL) e na presença de losartan	<b>133</b>
<b>Figura 59.</b> Curva concentração-efeito do veneno de <i>Apis mellifera</i> em aorta com o endotélio intacto sem inibidor de fosfolipase C e na presença de inibidor de fosfolipase C.....	<b>134</b>
<b>Figura 60.</b> Curva concentração-efeito em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca <sup>2+</sup> 1mM com veneno total de <i>Apis mellifera</i> , com a fração complexada PLA <sub>2</sub> + melitina, com a fração isolada de PLA <sub>2</sub> e melitina .....	<b>135</b>
<b>Figura 61.</b> Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado .....	<b>136</b>

<b>Figura 62.</b> Fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone.....	<b>167</b>
<b>Figura 63.</b> Mecanismos celulares envolvido na contração.....	<b>170</b>
<b>Figura 64.</b> Localização anatômica da artéria e veia femoral e posicionamento dos cateteres arterial (vermelho) e venoso (azul). .....	<b>172</b>
<b>Figura 65.</b> Traçado do efeito de diferentes concentrações de <i>Apis mellifera</i> (1-100µM) na pressão arterial de ratos “in vivo” .....	<b>174</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **83**
- Tabela 2.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL. .... **85**
- Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **87**
- Tabela 4.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 1,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **89**
- Tabela 5.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **91**
- Tabela 6.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **93**
- Tabela 7.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl<sup>-</sup>) nos experimentos realizados com o veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL ..... **95**
- Tabela 8.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **98**

**Tabela 9.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **100**

**Tabela 10.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **102**

**Tabela 11.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL..... **104**

**Tabela 12.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **106**

**Tabela 13.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **108**

**Tabela 14.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na concentração de 1,8µg/mL ..... **110**

**Tabela 15.** Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno da serpente *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL). ..... **124**

**Tabela 16.** Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de ( 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL). ..... **128**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>30</b>
1.1	Considerações gerais .....	31
1.2	Epidemiologia dos acidentes causados por abelhas .....	33
1.3	Família <i>Apidae</i> : taxonomia e distribuição geográfica.....	36
1.4	Características da família <i>Apidae</i> .....	39
1.5	Composição química do veneno de abelha .....	44
1.6	Efeitos clínicos do veneno de abelha .....	47
1.7	Justificativa .....	50
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>52</b>
2.1	Geral.....	53
2.2	Específicos .....	53
<b>3</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>54</b>
3.1	Animais de experimentação.....	55
3.2	Veneno, fármacos e reagentes utilizados.....	55
3.3	Células MDCK .....	55
3.4	Perfusão de rim isolado .....	56

3.4.1 Sistema de perfusão renal .....	56
3.4.2 Calibração do sistema .....	57
3.4.3 Solução perfusora .....	59
3.4.4 Técnica cirúrgica .....	59
3.4.5 Protocolo experimental .....	65
3.4.5.1 Veneno total.....	65
3.4.5.2 Frações complexada (PLA <sub>2</sub> + melitina).....	66
3.4.6 Análises bioquímicas .....	65
3.4.7 Cálculos dos parâmetros renais avaliados .....	66
3.4.8 Estudo histológico renal .....	68
3.5 Ensaio com cultura de célula .....	69
3.5.1 Cultivo das células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) .....	69
3.5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	69
3.6 Anel de aorta .....	73
3.6.1 Técnica cirúrgica .....	73
3.6.2 Protocolos experimentais .....	76
3.6.2.1 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	77
3.6.2.2 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> em meio livre de cálcio na presença de EGTA.....	77
3.6.2.3 Efeito do veneno total de <i>Apis mellifera</i> em meio com fentolamina, verapamil, losartan e inibidor da fosfolipase C (U- 73122) .....	77
3.6.2.3 Efeito das frações PLA <sub>2</sub> e melitina isolados, e efeito do complexo da fração (PLA <sub>2</sub> + melitina) do veneno de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	78

3.7.3 Estudo histológico dos anéis de aorta.....	78
3.8 Análises estatísticas .....	78
3.9 Aspectos éticos.....	79
<b>4 Resultados.....</b>	<b>80</b>
4.1 Perfusão renal .....	81
4.1.1 Perfusão renal do veneno total.....	81
4.1.2 Perfusão renal com as frações PLA <sub>2</sub> +mellitina.....	96
4.1.2 Histologia dos rins perfundidos .....	111
4.2 Ensaio com cultura de células .....	122
4.2.1 Ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade .....	122
4.3 Anel de aorta com endotélio .....	129
4.3.1 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na tensão basal de aorta isolada na presença e na ausência de cálcio .....	129
4.3.2 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de fentolamina.....	131
4.3.3 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de verapamil.....	132
4.3.4 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de losartan.....	133

4.3.5 Efeito do veneno total de <i>apis mellifera</i> na presença de inibidor da fosfolipase C (u – 73122).....	134
4.3.6 Efeito das frações PLA <sub>2</sub> e melitina isoladas, e efeito do complexo de fração (PLA <sub>2</sub> + melitina) do veneno de <i>Apis mellifera</i> na tensão basal .....	135
4.4 Histologia dos anéis de aorta.....	136
<b>5 Discussão dos resultados .....</b>	<b>137</b>
<b>6 Considerações finais .....</b>	<b>149</b>
<b>7 Conclusão .....</b>	<b>152</b>
<b>8 Referências bibliográficas.....</b>	<b>155</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>165</b>

# INTRODUÇÃO

*A teoria sem a prática vira 'verbalismo', assim como a prática sem teoria, vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.*

*Paulo Freire*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde o tempo dos Hebreus, Gregos e Egípcios, há relatos da importância econômica dos insetos sociais (WILSON, 2007). No entanto, somente dezenove séculos após o início da Era Cristã (ou Era Comum), os venenos desses animais despertaram interesses de pesquisadores (SPRADBERY, 1973).

O Brasil é um país com características climáticas e geográficas muito variadas, possuindo assim, uma ampla diversidade biológica. Desta forma, é considerado como um ambiente rico para diversos estudos com produtos naturais, os quais constituem uma fonte de novos compostos para serem utilizados na terapêutica (PALMA *et al.*, 2012).

Os insetos são os mais numerosos grupos de animais da biosfera, podendo ser classificados de acordo com suas relações com o homem em insetos úteis e nocivos (GARCIA, 1999). Juntamente com os crustáceos e outros artrópodes, compõem cerca de 70% das espécies existentes no planeta, mas somente a Classe *Insecta* possui diversidade maior que qualquer outro animal terrestre já descrito até os dias de hoje (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

Os insetos possuem uma diversidade química em seu veneno, que é utilizado na defesa contra predadores. Em geral, os insetos possuem a capacidade de metabolizar compostos orgânicos oriundos de plantas, que são adquiridos durante sua dieta alimentar, e esses compostos tornam-se potencialmente úteis no mecanismo de defesa (LIMA; de LIMA; PREZOTO, 2000).

As abelhas pertencem ao filo *Artrópoda* (do grego *arthros* ou articulação + *podos* ou pé), à classe *Insecta* e à Ordem Hymenoptera. A classe *Insecta* é composta por mais de um milhão de espécies, apresentando os mais importantes invertebrados, que podem viver em ambientes secos e úmidos. A ordem *Hymenoptera* é formadora de mais de 200.000 espécies, da qual possui interesse clínico significativo, uma vez que muitos envenenamentos de importância médica

são causados por membros pertencentes às famílias *Apidae* (abelhas), *Formicidae* (formigas) e *Vespidae* (vespas). Há também um grande interesse em estudos relacionados à caracterização química, aos mecanismos de ação e à farmacologia dos componentes das peçonhas de insetos dessa Ordem Hymenoptera (STEEN *et al.*, 2005).

Acidentes por abelhas são bastante comuns e em geral têm curso benigno. Entretanto, eventualmente, podem surgir complicações mais graves. É uma característica importante nas fêmeas dos himenópteros, a presença de ferrão ou aguilhão, que é uma eficiente arma de ataque e defesa. São característicos nos acidentes por abelhas, os ferrões com as glândulas produtoras de veneno permanecem na pele após a picada (LEÃO, 1997).

Os aspectos fisiopatológicos, epidemiológicos e ambientais de grupos de artrópodes, como aranhas, insetos e centopéias em regiões tropicais, são escassos de estudos na literatura. O conhecimento limitado e a benignidade clínica de acidentes envolvendo artrópodes contribuem para a subnotificação. Estudo realizado no Centro de Assistência Toxicológica de Pernambuco (CEATOX) verificou que as notificações envolvendo abelhas foram as mais frequentes, com 37,4% dos casos, seguidas de centopéias, com 18,9%, percebendo-se uma tendência de aumento no registro de casos ao longo dos anos (FREITAS *et al.*, 2006).

Diante da necessidade de se estudar as ações e os aspectos envolvendo os venenos produzidos pelos animais peçonhentos, confirma-se que a Toxinologia, a ciência que trata do estudo de toxinas derivadas de microrganismos, plantas, animais e suas consequências no organismo humano, é uma ciência em contínua expansão no Brasil e no mundo. Estão inseridos nesse contexto as plantas tóxicas, as bactérias, os fungos produtores de toxinas, as serpentes, escorpiões, abelhas, vespas, formigas, animais marinhos e aranhas (SOARES, 2005).

As toxinas são produzidas com o intuito de defesa contra possíveis presas e inimigos, mas por outro lado, podem ser essenciais para novas aplicabilidades terapêuticas, pois contribuir para a descoberta de ferramentas farmacológicas e para a compreensão do seu mecanismo de ação, proporcionando a melhoria nos

protocolos de tratamento de pacientes envolvidos em acidentes com esses seres vivos (LEWIS; GARCIA, 2003). Estudos com toxinas de origem animal também têm contribuído muito na compreensão de problemas vasculares, neurológicos, processos inflamatórios, analgesias, processos alérgicos, asma e outros, pois venenos de invertebrados apresentam grande importância devido à sua ação bioativa (MORTARI *et al.*, 2007).

Como um marco científico das toxinas na descoberta de fármacos, destaca-se o agente terapêutico Captopril, o qual age inibindo a enzima conversora de angiotensina. Esse achado foi iniciado pelos estudos de Rocha e Silva *et al.* (1949), culminando com as pesquisas de Sérgio Ferreira, que isolou a molécula conhecida como fator potencializador da bradicinina (BPF), substância com atividade vasodilatadora e hipotensiva presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca*. A partir desse momento, deu-se o ponto de partida para o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos anti-hipertensivos (FERREIRA, 1965). Finalmente, os estudos para o desenvolvimento da molécula final do Captopril foram feitos por Cushman e Odentii (LEWIS; GARCIA, 2003).

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES CAUSADOS POR ABELHAS**

O aumento dos acidentes envolvendo abelhas africanizadas no Brasil e em toda a América, nas últimas décadas, passou a ser objeto de vigilância das autoridades sanitárias, devido ao fato de acidentes com centenas de abelhas estarem associadas não somente a relatos de processos alérgicos, mas também a quadros de envenenamento. Uma das complicações sistêmicas mais severas após um acidente por abelhas é a insuficiência renal aguda (IRA), que além de ser algo bastante grave, é um quadro comum nos casos em que o paciente evolui ao óbito. O crescente número de casos de óbitos alerta para a necessidade de se dispor de um tratamento eficaz (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

Os dados disponíveis sobre acidentes com animais peçonhentos no Brasil eram obtidos, até a década de 80, geralmente, através de relatos e não se conhecia a incidência desses acidentes, pois os dados epidemiológicos eram dispersos e incompletos, porém a hipersensibilidade provocada por picada de insetos era estimada, na literatura médica, em valores de 0,4% a 10% nas populações estudadas (BRASIL, 2001).

Os acidentes provocados por aranhas, escorpiões, abelhas, vespas e outros animais peçonhentos de interesse médico-sanitário passaram a ser de notificação obrigatória, a partir de 1988, fazendo parte do Programa de Controle dos Acidentes por voluntário (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

Na Europa, a prevalência de indivíduos alérgicos a venenos de Hymenoptera é de aproximadamente 20% e a incidência de casos fatais varia de 0,1 a 0,5 por milhão de habitantes por ano, resultando em cerca de 100 mortes / ano. Em relação aos acidentes causados por ferroadas de Hymenoptera, 32,6% dos acidentes são ocasionados por vespas, 28,2% por abelhas e 26,8% por formigas (ESCHER *et al.* 2001).

Desde 1993, na ficha de investigação do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da secretaria de Saúde de São Paulo, nos casos de acidentes ocasionados por animal peçonhento, as abelhas passaram a constar como “animal agressor”, tendo sido registradas 30.292 notificações de acidentes no período compreendido entre os anos de 1993 a 1997. Dessas notificações, na média para todo o período, 6,3% ocorreram por causa de himenópteros, dos quais 89,7% eram abelhas africanizadas (MELLO *et al.*, 2003).

Em relação à incidência de acidentes causados por Hymenoptera, mais especificamente as abelhas, grande parte ocorre na zona rural, e em países tropicais, a sensibilização ocasionada por venenos dessa Ordem ocorre em 9,3 a 28,5% dos indivíduos acidentados (ANTONICELLI *et al.*, 2002).

Foram verificados, em 2008, no Brasil, que, de um número de 94.584 acidentes causados por animais peçonhentos, a totalidade de casos de acidentes por abelhas foi de 5.605 e a letalidade foi de 0,23%. Esse número total de acidentes representou uma incidência nacional de 3/100.000 habitantes, podendo-se destacar a região Sul como a que apresentou a maior incidência dentre as regiões do país (5,8/100.000 habitantes) (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

No Ceará, os dados atuais da secretaria de saúde relatam que entre os anos de 2007 a 2011, ocorreram 8.619 casos de acidentes por animais peçonhentos, e, dentre eles, 775 casos foram ocasionados por abelhas, ou seja, aproximadamente 9,0%. Desse número total de acidentes causados por abelhas, 62% foram relacionados ao sexo masculino; a faixa etária mais acometida foi a de 20 à 59 anos de idade, representando 60 % dos acidentes, e, 88 % dos casos foram de pacientes originados do interior do Estado. O número total de óbitos por picadas de abelhas nesse período foi de 21 casos (SINAN/SESA/CE, 2012).

As notificações da vigilância epidemiológica nos acidentes por animais peçonhentos devem constituir o alicerce para formulação de estratégias que permitam, a partir do patamar atual, iniciar o declínio da tendência ascendente dos casos de acidentes por abelhas africanizadas (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009).

A importância que envolve o tema se revela na qualidade dos dados epidemiológicos, verificando-se a urgente capacitação de profissionais que realizam a assistência aos pacientes e dos responsáveis pela vigilância e sistema de informações no âmbito dos Estados e Municípios. Dessa forma, o aumento crescente nas notificações de acidentes por abelhas retrata a necessidade de uma maior descentralização das ações de saúde, pois na medida em que isso ocorre, aumenta a efetividade da vigilância e do controle dos casos.

### 1.3 FAMÍLIA APIDAE: TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os himenópteros são uma ordem de insetos que inclui abelhas, formigas e vespas. Em relação à taxonomia, insere-se as abelhas de acordo com a figura 01.



**Figura 1.** Classificação taxonômica da abelha *Apis mellifera* (NOGUEIRA-NETO, 1972).

As abelhas de gênero *Apis* e espécie *Apis mellifera* são de grande importância econômica e são divididas em várias subespécies. Tendo em vista o crescimento da apicultura, foram trazidas para o Brasil várias sub-espécies, senão vejamos:

A abelha *Apis mellifera mellifera* foi introduzida em 1839 e tem a sua origem no Norte e Oeste dos Alpes Europeus e Rússia Central. É conhecida popularmente como abelha do reino, da Europa ou abelha preta. Antes da introdução das abelhas africanas, a *Apis mellifera mellifera* era a raça predominante no Brasil. Como

particularidade, esses insetos são grandes, têm a coloração preta, possuem abdômen largo e o corpo recoberto de pêlos (NOGUEIRA-NETO, 1972).

A *Apis mellifera ligustica*, sub-espécie essa que além de ser conhecida como abelha italiana, é a mais cultivada no mundo. Essas abelhas, que foram introduzidas no Brasil em 1870, pelo apicultor Frederico Hanneman, apresentam como característica importante em seu corpo uma coloração amarelo ouro, coberta por pêlos compridos. No zangão, a cor é mais acentuada e uniforme, já a rainha pode ser facilmente localizada entre as operárias. As abelhas italianas são mansas e de fácil manuseio, por isso ficam calmas nos favos e são pouco enxameadoras (FRANÇA *et al.*, 1994).

A *Apis mellifera adansonii* tem origem no continente Africano e foi introduzida no Brasil em 1956. Relata-se que seu comportamento é bem diferente quando comparado ao das abelhas européias. As africanas são muito agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Apresentam porte menor, cor amarelo-limão no abdômen e listas negras transversais que vão aumentando de largura até formar uma parte negra e brilhante (NOGUEIRA-NETO, 1972).

A *Apis mellifera scutellata* originária também do continente Africano, foi introduzida no Brasil na região de Rio Claro-SP, em 1956, para fins científicos, mas acabou escapando do apiário para a natureza, alastrando-se para todo o continente. No cruzamento com as raças européias aqui existentes, produziu um “híbrido” que passou a ser chamado de abelha africanizada. Assim como a *Apis mellifera adansonii*, essas abelhas são agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Como diferencial, a *Apis mellifera scutellata* é bastante produtiva e madrugadeira, pois trabalha até o final do dia, mas são migratórias. Apresentam porte pequeno e cor amarelada nos zangões e nas operárias (BUCHMANN, NABHAN, 1996).

Como parte de um programa de cruzamentos, abelhas produtoras de mel foram trazidas da Tanzânia, na África, para o Brasil em 1956. O pesquisador Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr propôs-se a produzir um “híbrido” que fosse mais apropriado para atender ao mercado de produção de mel nacional, já que as abelhas européias eram as que até então habitavam o país e as que mais

produziam mel, no entanto não toleravam o clima quente. Sendo assim, o principal objetivo do projeto era conseguir abelhas que sintetizassem a quantidade de mel produzida pelas abelhas européias, mas que ao mesmo tempo tolerassem o clima quente, como as abelhas africanas (KERR, 1967).

Em março de 1957, vinte e seis enxames das abelhas africanas importadas, escaparam das colméias em cruzamento, e, atualmente, as abelhas encontradas no Brasil são esses “poli-híbridos”, conhecidos como abelhas africanizadas, que foram resultantes dos cruzamentos entre *Apis mellifera scutellata* e as seguintes sub-espécies: *A. m. mellifera*, vinda do norte da Europa; *A. m. ligustica*, proveniente da Itália; *A. m. caucásica*, encontrada na Rússia e repúblicas transcaucasianas; e *A. m. carniça*, encontradas na Península Balcânica (STORT; GONÇALES, 1994).

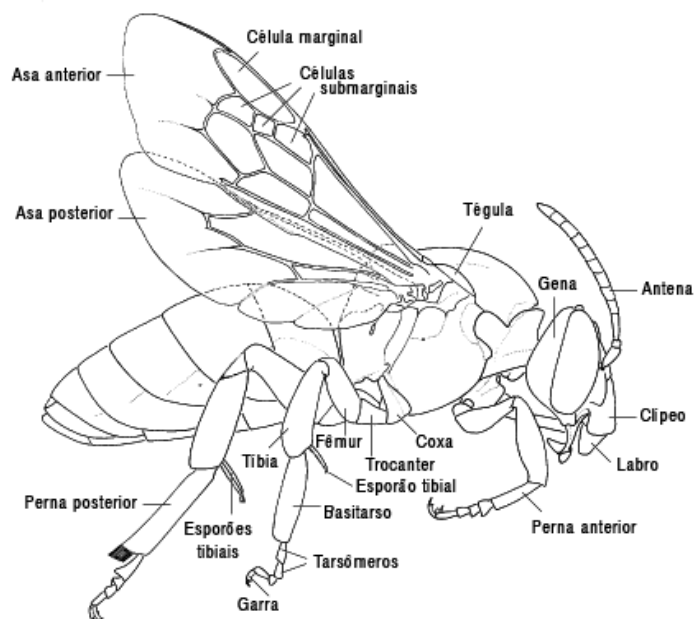
Essas abelhas espalharam-se rapidamente do Brasil para áreas distantes como Argentina, Texas, Arizona, Novo México, Califórnia e Nevada. Muitos especialistas acreditam que as abelhas africanizadas (AA), que apresentam como característica um comportamento agressivo, continuarão a migrar, podendo tornar-se “endêmicas” no Sul dos EUA, incluindo os estados da Louisiana, Mississipi, Alabama, Flórida e partes da Georgia, representando um grave problema para a saúde pública (SCHUMACHER, EGEN, 1995; KAPLAN, 2006).

O deslocamento dessas abelhas, oriundo dos cruzamentos, foi mais rápido no Nordeste do Brasil, aproximadamente 500 km/ano, onde o clima é tropical seco; de 200 a 250 km/ano em clima úmido, tais como florestas tropicais da Bacia Amazônica e Guianas; em direção ao Paraguai e Bolívia foi de aproximadamente 150 km/ano e tornou-se zero após os paralelos 33 e 34, entre as províncias de Entre Rios, Santa Fé, Córdoba na Argentina e São Luiz no maranhão (FUNASA, 2009).

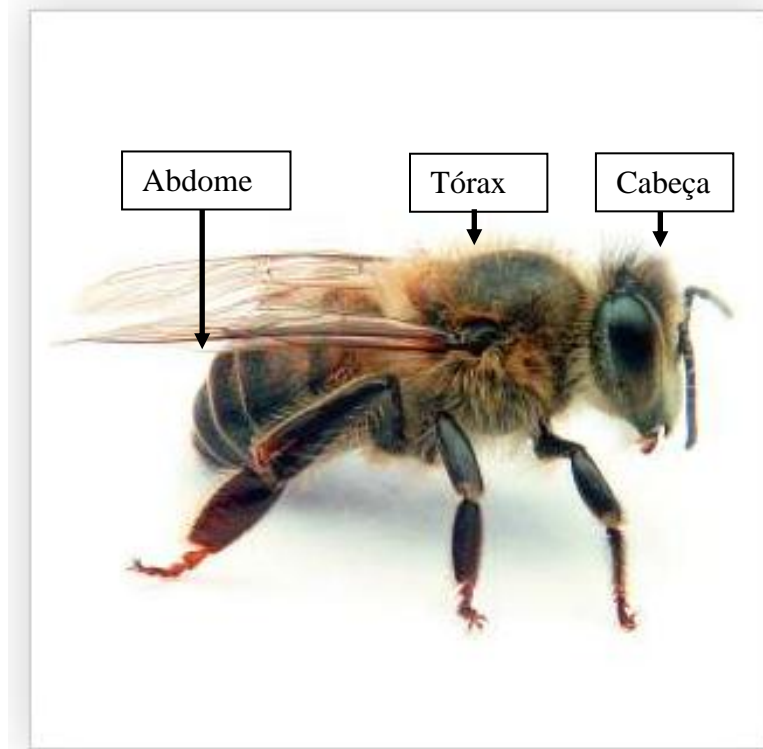
## 1.4 CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA APIDAE

A camada externa do corpo das abelhas, como em todos os artrópodes, é formada pela cutícula. A cutícula é seu exoesqueleto, estrutura essa que tem as funções de proteger os órgãos internos, evitar a perda de água e dar sustentação para os músculos. O exoesqueleto não é uma camada contínua, mas constitui-se de placas rígidas de espessura variável, unidas umas às outras ou conectadas por áreas membranosas que conferem elasticidade e flexibilidade ao corpo (FREE, 1980).

O corpo das abelhas, como o de todos os insetos, constitui-se também de três partes principais (tagmas ou tagmata): cabeça, tórax e abdome (Fig. 02 e 03). No caso das abelhas e outros himenópteros Apocrita, como as formigas e as vespas, o primeiro segmento do abdome é unido ao tórax, recebendo o nome de propódeo. A seguir, foi descrito de forma sucinta cada uma dessas partes, destacando aquelas que apresentam maior importância para o desempenho das diversas atividades das abelhas (SILVEIRA *et al.*, 2002).

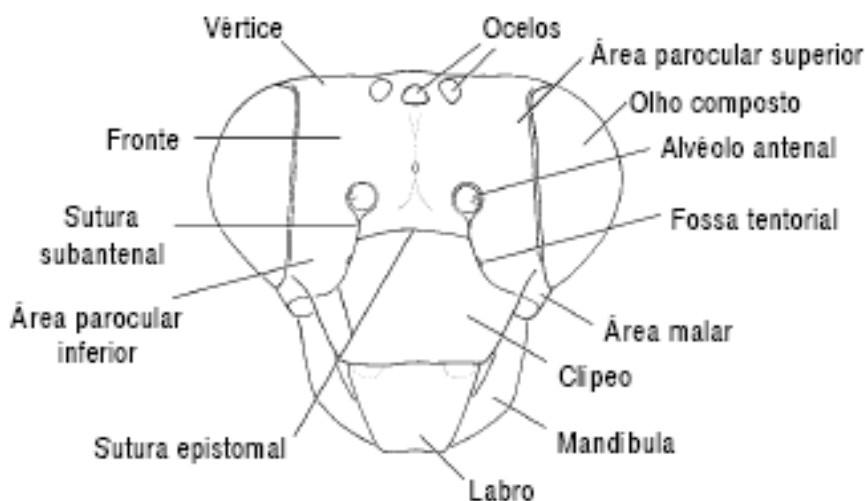


**Figura 02.** Aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).



**Figura 03.** Fotografia de abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).

A cabeça das abelhas contém dois olhos compostos laterais, três ocelos dorsais, um par de antenas, um par de mandíbulas e o aparelho bucal (Fig. 04). A cabeça pode ser dividida em diversas regiões, geralmente delimitada por suturas. A região dorsal, que fica entre os olhos compostos e os ocelos, é chamada vértice; a região anterior, localizada acima da inserção das antenas, é a fronte; a região situada entre a margem inferior dos olhos e a base das mandíbulas é a área ou espaço malar (DADE, 1994).

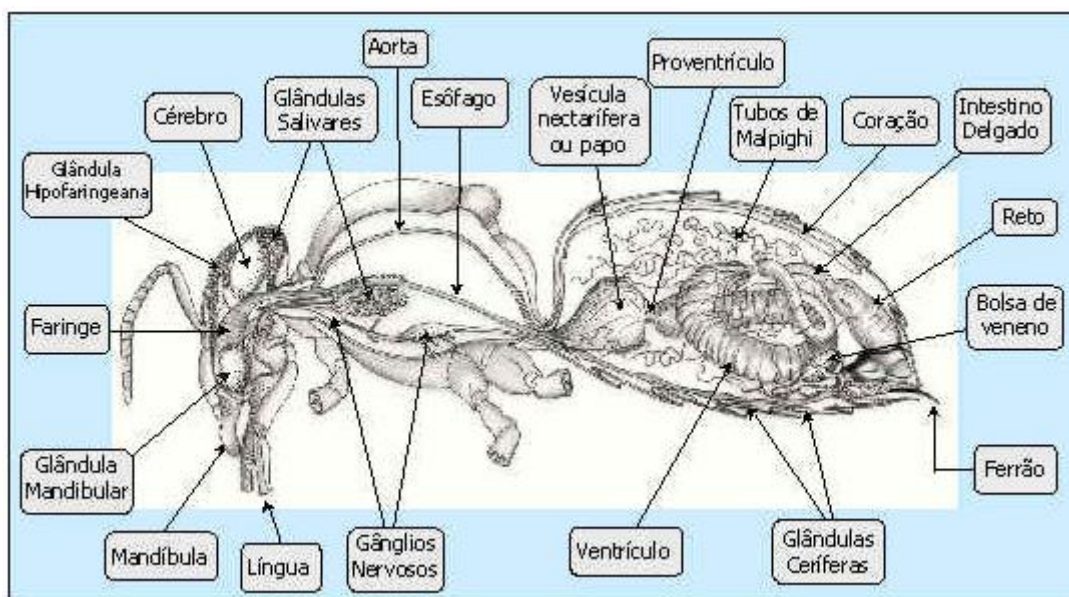


**Figura 04.** Cabeça da abelha demonstrando os aspectos da morfologia externa de *Apis mellifera* (SILVEIRA *et al.*, 2002).

No tórax encontram-se os órgãos locomotores (pernas e asas), destacando-se a presença de grande quantidade de pêlos, que possuem importante função na fixação dos grãos de pólen quando as abelhas entram em contato com as flores. No tórax, também são encontrados espiráculos, que são os órgãos de respiração; o esôfago, que é parte do sistema digestório; e as glândulas salivares envolvidas no processamento do alimento (MEYER, WIESE, 1985).

As abelhas, como os demais insetos, apresentam três pares de pernas. As pernas posteriores das operárias possuem diversas funções, e dentre elas estão a de locomoção, manipulação da cera e própolis, limpeza das antenas, das asas e do corpo e também a de agrupar as abelhas quando formam "cachos". As asas desses animais são constituídas por dois pares, os quais têm uma estrutura membranosa que possibilitam o voo a uma velocidade média de 24 km/h (JAISON, 1982).

O abdome é formado por segmentos unidos por membranas bastante flexíveis que facilitam o movimento. Nesta parte do corpo, encontram-se órgãos do aparelho digestório, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa e glândulas produtoras de cera (Fig. 05) (CHAPMAN, 1998).



**Figura 05.** Foto de abelha demonstrando os aspectos da anatomia interna de *Apis mellifera* (CAMARGO, 1972).

Na parte final do abdome, encontra-se a estrutura de defesa das abelhas, o ferrão, que está presente apenas nas operárias e rainhas. O ferrão é ligado a uma pequena bolsa, onde o veneno fica armazenado. Essa bolsa é movida por músculos que além de auxiliar na introdução do ferrão e injeção do veneno, provocam contrações musculares capazes de permitir que a toxina continue sendo injetada mesmo após o ferrão ter saído da abelha. Dessa forma, o ferrão deve ser retirado o mais rápido possível, para se evitar que o veneno seja absorvido na sua totalidade (HERMAN, 1982).

Na maioria dos casos, o ferrão fica preso na superfície picada, e quando a abelha tenta voar ou sair do local após a ferroadada, ocorre uma ruptura de seu abdome e em consequência sua morte. No entanto, vale ressaltar que nas rainhas, a musculatura ligada ao ferrão é bem mais forte do que nas operárias, com o objetivo de a rainha não perder o abdome após utilizar o ferrão (CRUZ-LANDIM, ABDALLA, 2002).

Os únicos insetos que possuem ferrões verdadeiros pertencem à ordem Hymenoptera, que apresentam três famílias de importância médica: Apidae (abelhas

e mamangavas), Vespidae (vespa amarela, vespão e marimbondo ou caba) e Formicidae (formigas). As mortes relatadas por ferrões de Hymenoptera são causadas por reações de hipersensibilidade imediata, mas, o envenenamento pode também causar a morte em indivíduos não alérgicos. As reações anafiláticas devidas à picada de Hymenoptera não dependem da dose do veneno e nem do número de picadas relatado (FITZGERALD, FLOOD, 2006).

As abelhas africanizadas (AA), que são geneticamente modificadas, apresentam comportamento agressivo e perigoso (ARECHAVALETA-VELASCO, 2003), acreditando-se que isso se deve aos ferormônios isolados das AA. Sendo assim, essas abelhas são consideravelmente mais agressivas que as abelhas européias quando atacam suas vítimas (PARK, 2006; HUNT, 2003).

Esses insetos podem perseguir suas vítimas por até quatrocentos metros (SHERMAN, 1995), e, um dos fatores que facilita os ataques é que as AA tendem a escolher locais próximos a áreas populosas para estabelecer suas colméias, colméias essas que uma vez perturbadas, poderão deixar a colônia agitada por até vinte e quatro horas, permanecendo, dessa forma, seu comportamento de ataque (WINSTON, 1994; ABRAMSON, AQUINO, 2002; KAPLAN, 2006).

No momento da ferroadada, o aparelho de ferroar é autônomo, ficando preso à pele da vítima, para garantir que a quantidade total do veneno (1-10  $\mu$ L) possa ser injetada. Relata-se que o agulhão, preso à pele, continua se contraindo por trinta a sessenta segundos, ejetando veneno e liberando odores de alarme para atrair outras abelhas para o ataque. Logo após esse ato de ferroar, dar-se-á a morte da abelha (SCHUMACHER *et al.*, 1994), pois quando o inseto for tentar voar ou sair do local ocorrerá uma ruptura de seu abdômen e conseqüentemente sua morte. (WINSTON, 1994).

Em relação às manifestações tóxicas sistêmicas, verifica-se que ocorrerão após 50 ferroadas simultâneas, mas a dose considerada letal em crianças é de 500 ferroadas, e em adultos, de 1100 (SHERMAN, 1995; SCHUMACHER, 1990).

A dose estimada de veneno de 1000 ferroadas, considerada fatal, é 1,3 mg/kg, ou 90 mg de veneno para um adulto. A fatalidade parece estar relacionada com a quantidade de veneno (expressa em miligramas) injetada na vítima, por quilograma de massa corpórea. Entretanto, algumas vítimas sobreviveram a mais de 1000 ferroadas (SHERMAN, 1995; SCHUMACHER, 1990).

## 1.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DE ABELHA

Inicialmente, os venenos de himenópteros apresentavam um pequeno uso direto na medicina moderna, mas essa situação vem mudando de forma rápida, já que mais informações estão se tornando disponíveis. Dessa forma, o estudo de venenos tem influenciado bastante as áreas da bioquímica, farmacologia e medicina moderna, pois essas toxinas oferecem boas fontes de concentrações de enzimas ativas, citotoxinas e neurotoxinas, que servem como ferramentas para o estudo do funcionamento subcelular dos sistemas nervoso e cardiovascular de mamíferos (MITCHELL, 2006).

Então, infere-se que o papel e o uso dos venenos aumentam cada vez mais à medida que novas técnicas de isolamento e identificação, e, especialmente, técnicas para a produção em massa de componentes individuais de venenos vêm sendo desenvolvidas (MITCHELL, 2006).

Em relação à composição do veneno, pode-se falar de maneira geral, que todo veneno é primariamente composto de proteínas, peptídeos e aminas, contendo fosfolipídeos, bradicinina, histamina, acetilcolina, dopamina e serotonina (PARK, 2006; SCHUMACHER, 1995). Os venenos de Hymenoptera, são compostos por aminas biogênicas, peptídeos básicos e proteínas de elevadas massas moleculares, principalmente enzimas (CASTRO, 1994; MÜLLER, 2002).

No veneno de *Apis mellifera*, as principais aminas biogênicas presentes são a histamina, a serotonina, a dopamina e a epinefrina. A histamina produz dilatação e

aumenta a permeabilidade dos capilares sanguíneos, mas em concentrações elevadas, pode causar colapso vascular. Um dos principais papéis da histamina é facilitar a difusão das toxinas nos tecidos, estando também relacionada com o processo da dor em mamíferos. Acredita-se que a serotonina, bem como a histamina, também seja um agente difusor do veneno (DOTIMAS, HIDER, 1987; OWEN, SLOSEY, 1988).

Os principais componentes protéicos do veneno de abelhas da espécie *Apis mellifera* são: fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidase e fosfatase ácida. A PLA<sub>2</sub> é um dos principais componentes imunogênicos do veneno de abelhas e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação sinérgica com a melitina (SCHUMACHER, EGEN, 1995, 1996; OWNBY, 1997). A fosfolipase A<sub>2</sub> que é de natureza glicoprotéica, hidrolisa fosfolipídeos presentes nas membranas plasmáticas, formando poros e causando, assim, a lise celular. Produtos da hidrólise (comumente ácido aracdônico) podem servir como precursores para mediadores da dor tais como: leucotrienos e prostaglandinas (DOTIMAS, HIDER, 1987).

A PLA<sub>2</sub> apresenta diversas atividades, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica e atividade de agregação de plaquetas (LANDUCCI *et al.*, 1994; HUANG E CHIANG, 1994). A liberação de lisofosfolipídeos pode desencadear padrões de acetilação para formar um fator de agregação plaquetária, um potente promotor da inflamação (VENABLE *et al.*, 1993).

O ácido hialurônico é responsável pelo preenchimento dos interstícios entre as células, possuindo propriedades adesivas e promovendo a união das células. Quando o ácido hialurônico é hidrolisado pela enzima hialuronidase, o interstício fica mais fluido, facilitando a difusão de outros componentes do veneno. Por esta razão, a hialuronidase é denominada “fator de difusão” (DOTIMAS E HIDER, 1987).

Vogt *et al* (1970) mostraram que uma combinação de melitina e PLA<sub>2</sub> lisaram eritrócitos sob condições nas quais nenhum deles atuou isoladamente. Charlotte *et al* (1997) apontaram que a melitina e a PLA<sub>2</sub> podem atuar de forma sinérgica para induzir a mionecrose das células de músculos esqueléticos. Foram relatadas por diversos autores evidências de que estes dois componentes atuam

sinergisticamente também em outras membranas biológicas e em vesículas fosfolípídicas sintéticas (MOLLAY, KREIL, 1974; FLETCHER, JIANG, 1993).

O veneno de abelhas é muito rico em peptídeos, tais como, a melitina, a apamina e o peptídeo desgranulador de mastócitos (HARVES, 1975).

A melitina é encontrada em grande quantidade e apresenta apenas 26 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 3 kDa. Este peptídeo representa cerca de 50% do peso seco do veneno de *Apis mellifera* e é seu principal componente (HABERMANN, 1972).

As principais funções fisiopatológicas da melitina são: ser responsável pela dor provocada durante a ferroada, apresentar características alergênicas, possuir atividade hemolítica, agir como fator de dispersão das toxinas do veneno, despolarizar a musculatura cardíaca, causar necrose de células musculares esqueléticas quando injetada por via intramuscular em camundongos, facilitar a entrada dos demais componentes do veneno no sistema circulatório da vítima da ferroada e dependendo da concentração no tecido, pode provocar vasoconstrição ou vasodilatação (DOTIMAS, HIDER, 1987; BRADRICK *et al.*, 1989; OWNBY *et al.*, 1997).

Outro peptídeo presente no veneno de abelhas é a apamina. Consiste de apenas 18 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 2kDa, sendo o menor peptídeo neurotóxico conhecido. A apamina não é lítica, mas exerce influência sobre as membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico. Em contraste à melitina, a apamina possui um modo de ação altamente específico. (HABERMANN, 1972).

A apamina, semelhante a muitas neurotoxinas de serpentes, se liga no tecido nervoso com grande afinidade aos canais de  $K^+$  ( $Ca^{+2}$ -dependente) (DOTIMAS, HIDER, 1987). Estudos com apamina injetadas intracerebrovascular e intraperitonal em ratos demonstraram efeitos similares, produzindo não somente sinais de envenenamento, como tremor e ataxia, mas também efeitos hemorrágicos nos pulmões (LALLEMENT *et al.*, 1995).

O peptídeo degranulador de mastócitos é constituído de 22 resíduos de aminoácidos, assemelhando-se estruturalmente à apamina. Por outro lado, apresenta duas pontes dissulfídicas, pontes que lhe diferenciam em relação à melitina. Como a melitina é um forte hemolisante e libera serotonina de trombócitos, o peptídeo desgranulador de mastócitos é inativo nesses casos (HABERMANN, 1972).

## 1.6 EFEITOS CLÍNICOS DO VENENO DE ABELHA

A composição dos venenos totais é formada por toxinas e enzimas, as quais através da sua ação sinérgica e aditiva, exercem efeitos em quase todas as células ou tecidos (GUTIERREZ, LOMONTE, 1989).

As manifestações clínicas resultantes de contatos com himenópteros (abelhas, vespas e formigas) são de natureza alérgica, que podem ser desencadeadas por apenas uma única ferroadada, ou de natureza sistêmica, que podem incluir hipotensão, taquicardia, náuseas, sudorese e hipotermia (FRANÇA, 1994).

A reação local a uma ferroadada de abelha consiste em eritema, urticária e angioedema, causando dor e prurido. Se o indivíduo for alérgico, pode apresentar coceiras, coriza e dores de cabeça, mas dependendo da gravidade e do grau de alergenicidade, pode desenvolver um choque anafilático (SHEEHY, 2002)

Fatores que têm contribuído para aumentar o número de ocorrências com esses insetos são a importação de linhagens de abelhas da África, com características mais agressivas e a crescente ocupação urbana (DE MELLO *et al.*, 2003).

A gravidade do acidente causado pelas abelhas africanizadas (AA) se dá, dentre outros motivos, devido ao grande número de abelhas envolvidas no ataque. Pode-se esperar um número maior de reações tóxicas devido a múltiplas ferroadadas, e à

associação às reações alérgicas. Vale ressaltar que é a dose acumulativa de várias picadas que contribui para a morbidade e mortalidade associadas aos incidentes com as abelhas africanizadas, e não à composição do veneno ou o volume de picada individual (AZEVEDO *et al.*, 2006).

As reações sistêmicas se dão devido à grande quantidade de veneno injetado durante um ataque massivo de AA. Sinais e sintomas iniciais incluem edema difuso, inflamação da pele, dor de cabeça, fraqueza, fadiga e tontura (SHEEHY, 2002). Quando o indivíduo é ferroadado por mais de 50 abelhas, geralmente observa-se náusea, vômito e diarreia (SCHUMACHER; EGEN, 1995).

Essas reações causadas por ferroadas de abelhas são mediadas por imunoglobulinas IgE específicas para os constituintes imunológicos destas peçonhas a indivíduos sensíveis. Os sintomas, que podem surgir numa escala de tempo que varia de minutos a algumas horas após a ferroadada, são os seguintes: urticária, angioedema, broncoespasmo, choque anafilático, hipotensão e até mesmo perda de consciência (BRASIL, 2001).

Em indivíduos que levam múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas, geralmente é detectada hemólise intensa, acompanhada por insuficiência renal, causada pela ação da apamina, melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> sobre a membrana eritrocitária. Esses indivíduos também podem evoluir rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal agudas. Nos casos letais, podem ainda apresentar necrose tubular aguda, com presença de cilindros de hemo e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais (BARRAVIERA, 1994).

Múltiplas ferroadas desenvolvem alterações nos músculos estriados esqueléticos, os quais apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação. Alguns indivíduos apresentam lesão subendocárdica com presença de necrose muscular cardíaca. O fígado pode apresentar sinais de degeneração hidrópica decorrente do grave envenenamento (BARRAVIERA, 1994.). Ferreira *et al* (1995) demonstraram que após a inoculação de peçonha de abelha em ratos Wistar, ocorreu lesão necrotizante cardíaca aguda, similar ao infarto humano.

Uma das complicações comuns nos acidentes com abelhas africanizadas é a hipotensão, que pode ser explicada pelo efeito vasoativo (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) da histamina, leucotrienos e outros mediadores químicos. Esses mediadores são liberados endogenamente pela ação da histamina, do peptídeo degranulador de mastócitos, da melitina e da fosfolipase A<sub>2</sub>, que compõem o veneno. Alguns experimentos realizados em coelhos, gatos e camundongos relataram hipotensão logo após a inoculação do veneno de *Apis mellifera*. A melitina produz queda na pressão arterial, é cardiotóxica e representa o principal componente do veneno. A fosfolipase A<sub>2</sub>, o segundo principal componente, também tem mostrado hipotensão acentuada em gatos e cães (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Dentre os efeitos tóxicos do veneno destacam-se a ação vasoativa da histamina e dos leucotrienos, que, liberados endogenamente, podem contribuir para o estabelecimento do edema e da congestão encontrados em vários órgãos. Esses achados foram descritos também em acidentes por múltiplas ferroadas, mostrando a possibilidade de sobreposição dos efeitos tóxicos com a insuficiência renal aguda. Sendo assim, em todos esses achados, verifica-se o papel da hemodinâmica renal e a sua fundamental importância para a manutenção do funcionamento do rim em pacientes acidentados por ferroadas de *Apis mellifera* (PENTEADO *et al.*, 2003).

Além de todas as manifestações citadas, o veneno das abelhas também pode ocasionar uma série de outras reações sistêmicas imediatas ou tardias. Ataques massivos de dezenas a centenas de ferroadas têm elevada toxicidade, podendo ocasionar a falência de diversos órgãos, tais como: coração, fígado e rim. As reações tóxicas incluem trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, hipercalemia, hiperglicemia e hipertensão (GRISOTTO *et al.*, 2006). A melitina é capaz de agregar plaquetas humanas de uma maneira dose-dependente, ativando a cascata do ácido araquidônico. Dessa forma, pode ser destacada a trombocitopenia, que promove hemorragias e acarreta complicações hemodinâmicas (TERRA *et al.*, 2006).

Para o tratamento de emergência às vítimas de ferroadas de abelhas, tem se empregado antihistamínicos, corticosteróides, broncodilatadores, vasodilatadores, bicarbonato, manitol e ventilação mecânica (MULLER *et al.*, 1991; BARRAVIERA, 1994). No entanto, mesmo após esse tratamento, tem se observado a morte de pacientes, entre 22 e 71 horas após o ataque maciço de picadas, alguns inclusive apresentando necrose hepatocelular, necrose tubular aguda, necrose focal subendocardial e coagulação intravascular disseminada (FRANÇA *et al.*, 1994).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A rica biodiversidade brasileira constitui uma grande oportunidade para a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico. Estima-se que 10 a 20% de todas as espécies conhecidas no mundo estão presentes no Brasil (cerca de dois milhões) e que muitas dessas espécies são encontradas exclusivamente no Brasil (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

Vários estudos objetivam descobrir a ação de toxinas animais e o mecanismo envolvido nos efeitos locais e sistêmicos. Para tanto, a ampliação do conhecimento sobre a ação das toxinas de venenos busca, na biodiversidade, ferramentas farmacológicas e/ou elucidação de mecanismos fisiopatológicos (PEIXOTO, 2003).

Desta forma, é cada vez maior a procura por moléculas ativas que possam atuar produzindo hormônios, ou ainda, potencializando o sistema renal e vascular (VERANO-BRAGA *et al.*, 2008).

As técnicas de revolução biotecnológica, como por exemplo, genômica, genômica funcional, proteômica, metabolômica e citômica têm fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. O sufixo "ômica" indica uma série de novas disciplinas e procedimentos que visam à identificação funcional e/ou estrutural de tecidos, células, padrões de expressão gênicos e características metabólicas. Essas estratégias encontram uma variedade de aplicações por meio do monitoramento de indicadores celulares ou bioquímicos, tais como a transcrição de

um gene específico ou variação da expressão/função de uma determinada proteína, envolvendo desde as etapas de identificação de alterações fisiológicas e/ou metabólicas induzidas pelo estado de doença até a avaliação dos efeitos dos fármacos sobre o organismo humano (BHOGAL, BALLS, 2008).

Apesar de promissoras, essas tecnologias apresentam algumas limitações, como: a necessidade de métodos capazes de interpretar e correlacionar de forma otimizada a imensa quantidade de informações geradas e a aplicação dos dados biológicos de forma racional e efetiva no planejamento de fármacos (BHOGAL, BALLS, 2008).

Os avanços científicos e tecnológicos nas interfaces entre a química e a biologia têm proporcionado oportunidades e desafios notáveis na área da saúde, com amplo destaque para dois componentes fundamentais: inovação e integração, que traduzem muito bem o papel central da química medicinal moderna (GUIDO *et al.*, 2010).

Logo, de acordo com todo o exposto, faz-se necessário um estudo no sentido de entender os complexos efeitos do veneno de *Apis mellifera* sobre os sistemas vasculares e renais, com o intuito de investigar os mecanismos celulares e moleculares, pois, tais informações podem contribuir para melhorar e embasar os protocolos terapêuticos, bem como para bioprospecção de possíveis aplicações dos componentes desse veneno como uma ferramenta farmacológica. Então, diante desses fatos, confirma-se a relevância do estudo da ação do veneno de abelha em tecidos e órgãos isolados.

# OBJETIVOS

*A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total da abelha *Apis mellifera* e de suas principais frações fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e Melitina, contribuindo para a melhoria de possíveis protocolos terapêuticos, com o propósito de contribuir na bioprospecção de novas ferramentas farmacológicas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- ⇒ Estudar os efeitos induzidos pelo veneno total e as frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera* em um sistema de perfusão de rim isolado de rato;
- ⇒ Observar as alterações histológicas em rins tratados com veneno total e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) da abelha *Apis mellifera*;
- ⇒ Estudar as alterações induzidas pelo veneno total de *Apis mellifera* em cultura de células de epitélio de túbulos renais de cães (células MDCK);
- ⇒ Estudar possíveis alterações vasculares em anel de aorta de rato utilizando veneno total, frações isoladas de PLA<sub>2</sub> e Melitina, e as frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) complexadas do veneno de *Apis mellifera*;
- ⇒ Verificar possíveis alterações histológicas em anéis de aorta expostos ao veneno de *Apis mellifera*.

# MATERIAL E MÉTODOS

*Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.*

*William Hazlitt*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 250 e 300g, obtidos do Biotério central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará foram usados nos experimentos. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, aclimatizados entre  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , luminosidade (12h de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlados, recebendo ração padrão (Biotec<sup>®</sup>) e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, eles eram submetidos a jejum de 8 a 12 horas com água “*ad libitum*”.

#### 3.2 VENENO, FÁRMACOS, REAGENTES E SAIS UTILIZADOS

O veneno total e as frações PLA<sub>2</sub> e melitina da abelha da espécie *Apis mellifera* foi cedido pelo professor Marcos Hikari Toyama, da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP). A caracterização química do veneno também foi realizada pelo grupo do professor Marcos Hikari Toyama (Anexo 1). Os fármacos, reagentes e sais utilizados para a realização dos experimentos foram obtidos da empresa Sigma<sup>®</sup> (Saint Louis, MO - EUA).

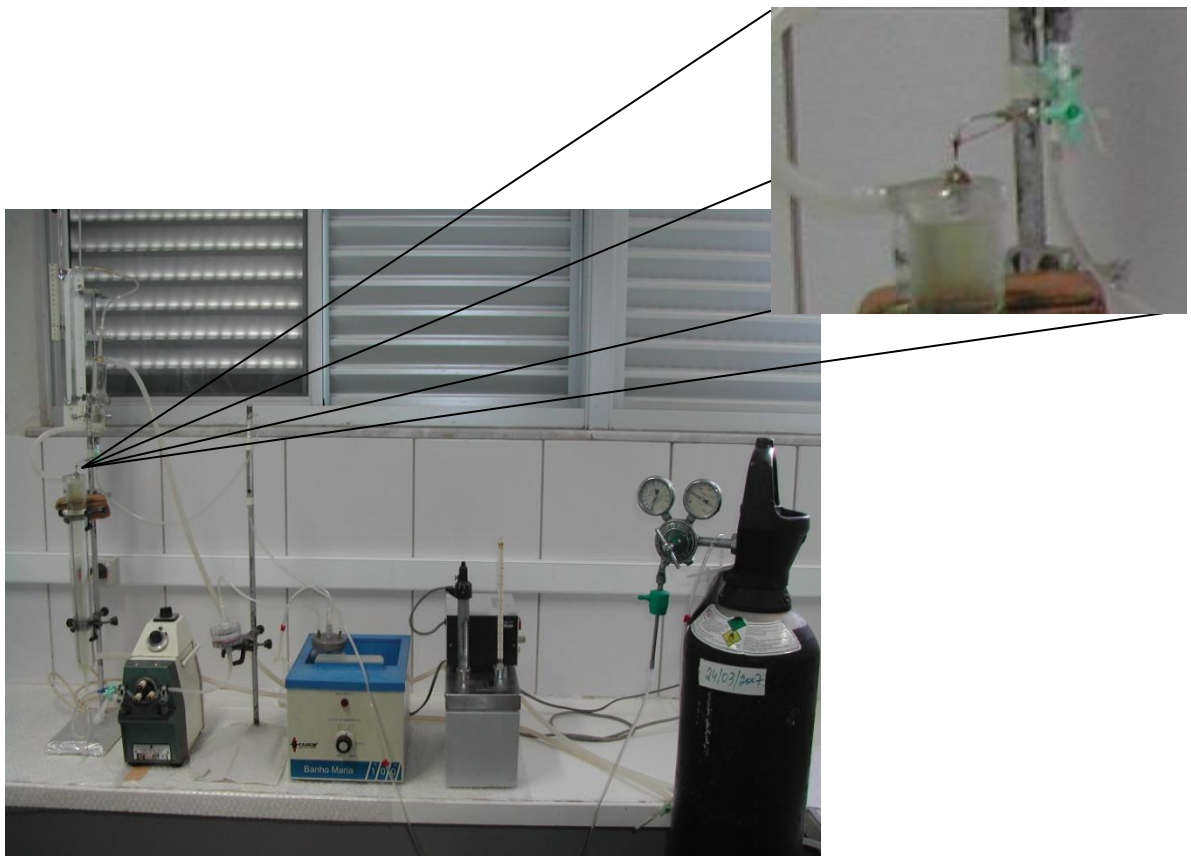
#### 3.3 CÉLULAS MDCK

As células MDCK foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo - USP) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Professora Dra. Alice Maria Costa Martins Nunes.

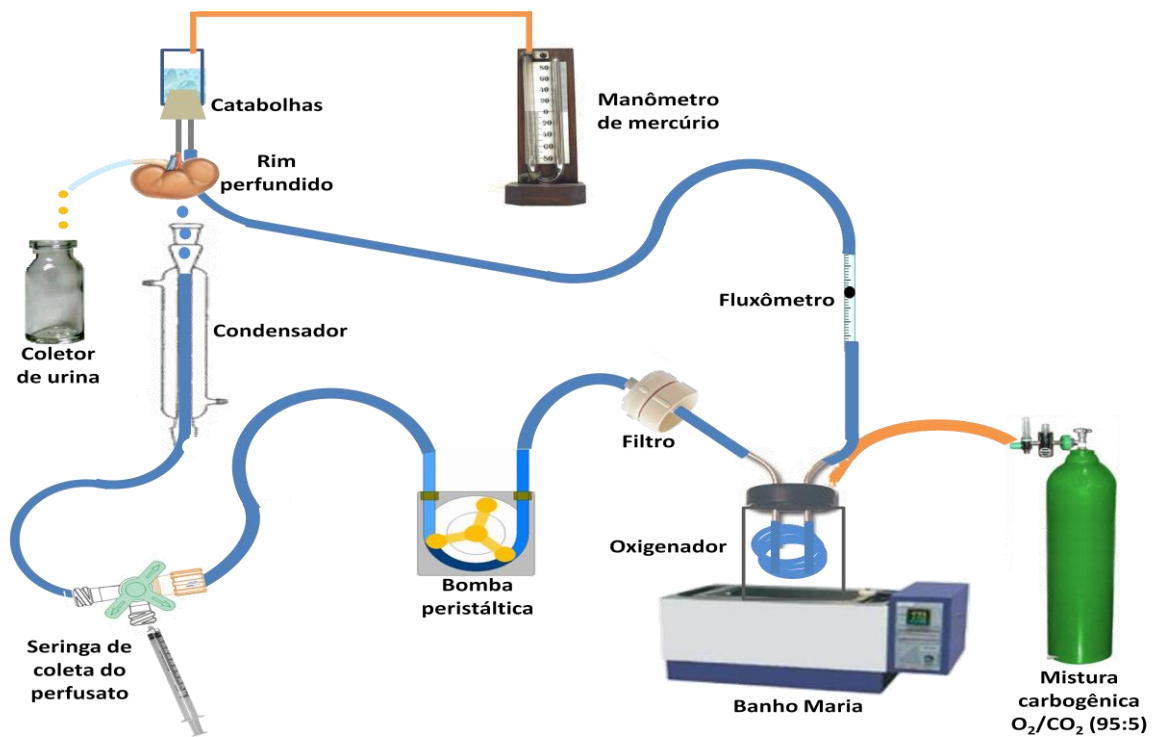
### 3.4 PERFUSÃO DE RIM ISOLADO

#### 3.4.1 SISTEMA DE PERFUSÃO RENAL

Com a finalidade de se verificar os efeitos do veneno de *Apis mellifera* em parâmetros renais, realizou-se experimentos com rins de isolados ratos. A necessidade do conhecimento dos mecanismos de controle da função renal levou inúmeros pesquisadores a desenvolverem a presente técnica de perfusão. O sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) e é composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado para perfusão *in vitro*, ambos mantidos à mesma temperatura (37 °C). O sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (em menor quantidade) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação adaptada ao próprio sistema, como demonstrado nas figuras 6 e 7.



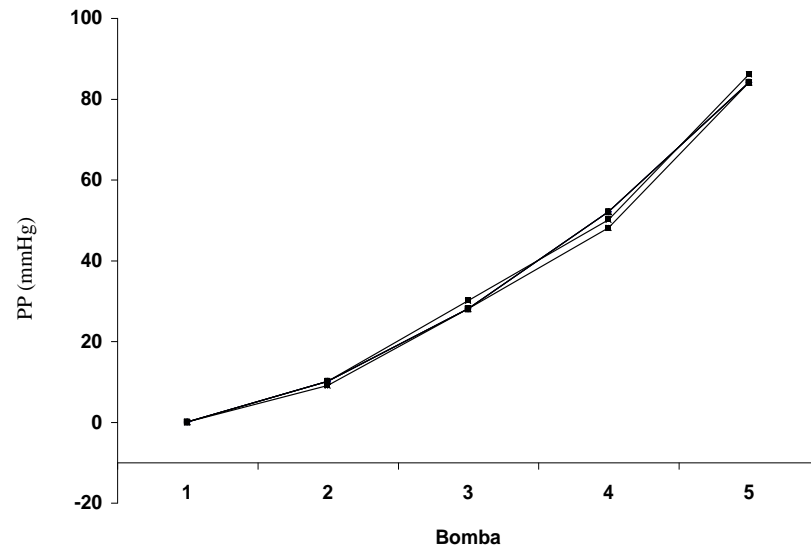
**Figura 06.** Fotografia do sistema de perfusão de rim isolado.



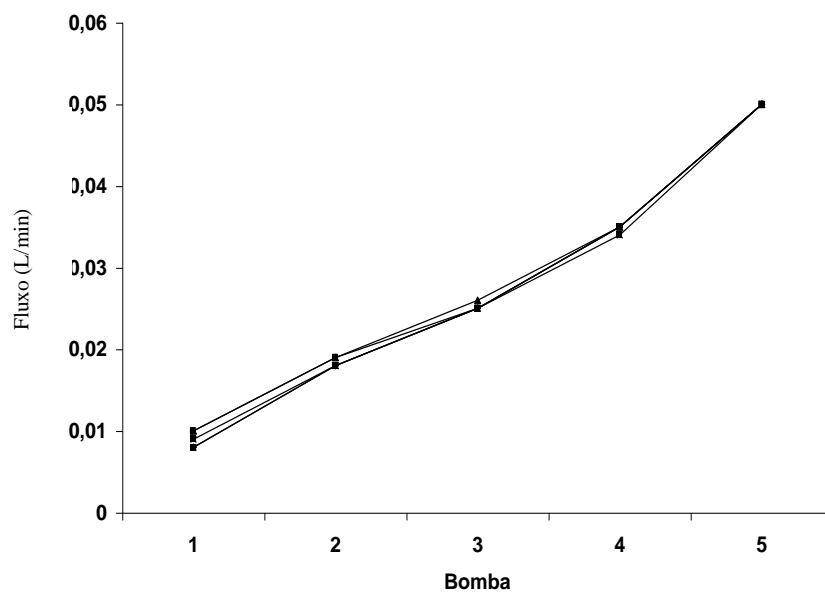
**Figura 07.** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado (SOUSA, 2010).

### 3.4.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

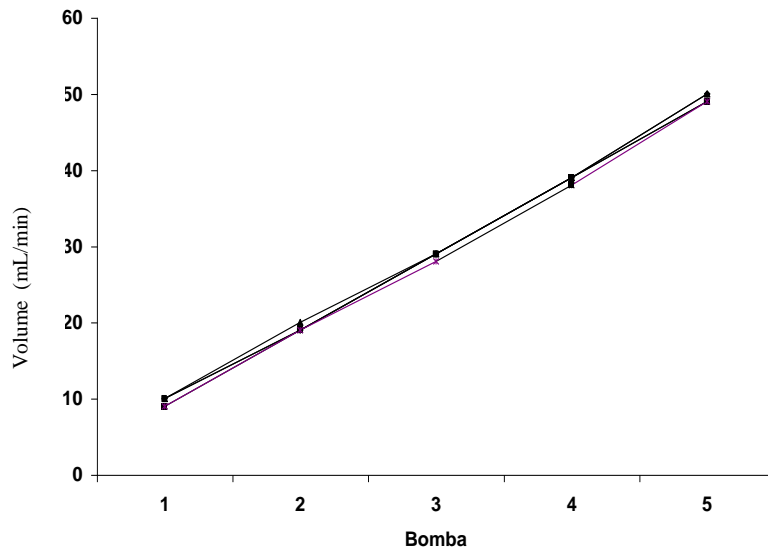
O sistema foi calibrado antes do início de cada experimento. Foram avaliados, em cada uma das bombas (de 1 a 5) a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min). Os resultados estão demonstrados nas figuras 8, 9 e 10.



**Figura 08.** Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 09.** Valores registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).



**Figura 10.** Valores de volume de solução (mL/min) registrados durante a calibração do sistema (n = 6).

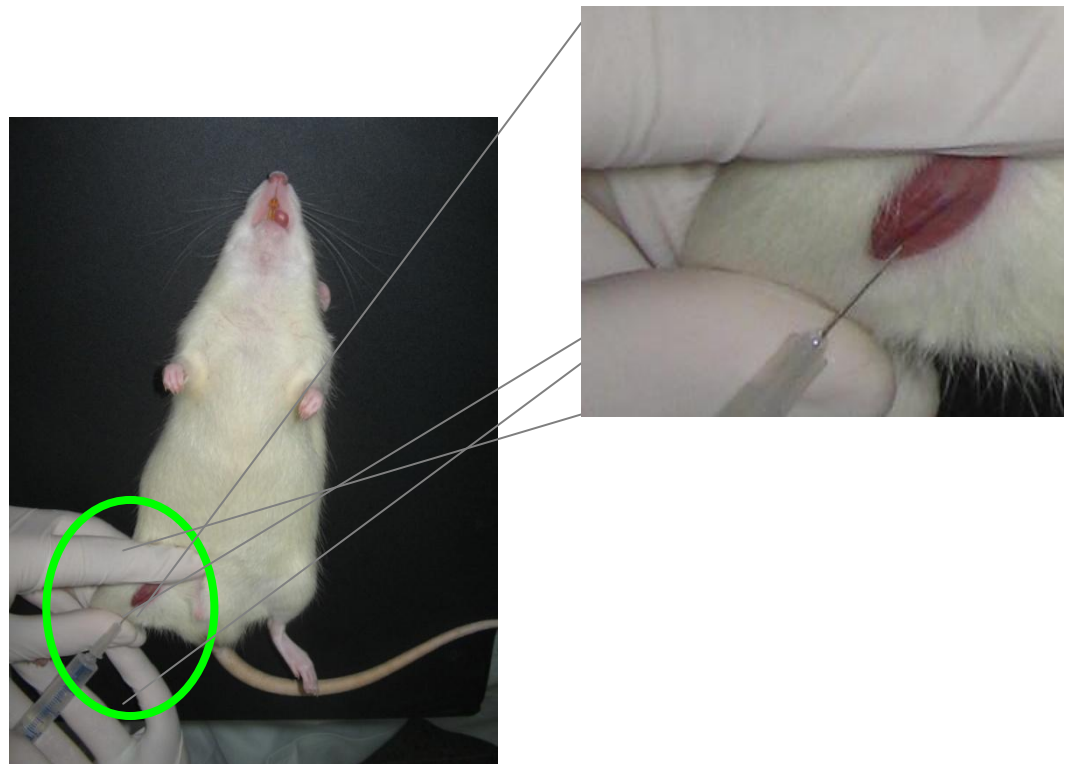
### 3.4.3 SOLUÇÃO PERFUSORA

A solução perfusora utilizada foi a de Krebs-Henseleit, contendo albumina bovina a 6% (p/v) e dialisada por 48 horas antes do experimento para retirar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (HANSON, BALLARD, 1968).

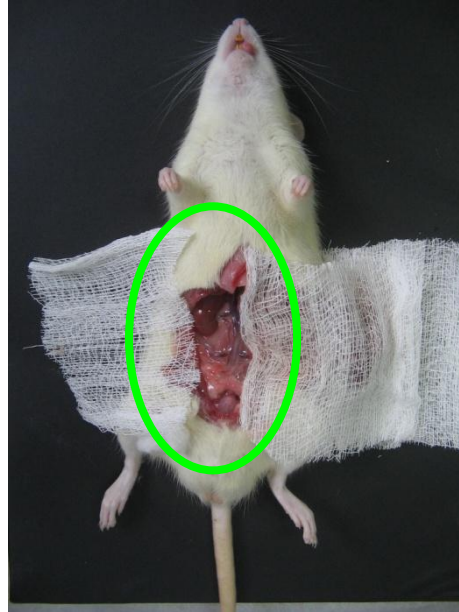
### 3.4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais (n=6) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, a veia femoral foi isolada e o manitol (300mg/3mL – independentemente do peso) foi administrado (figura 11), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter (BOWMAN, 1970).

Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor observação das estruturas anatómicas abdominais (figura 12).

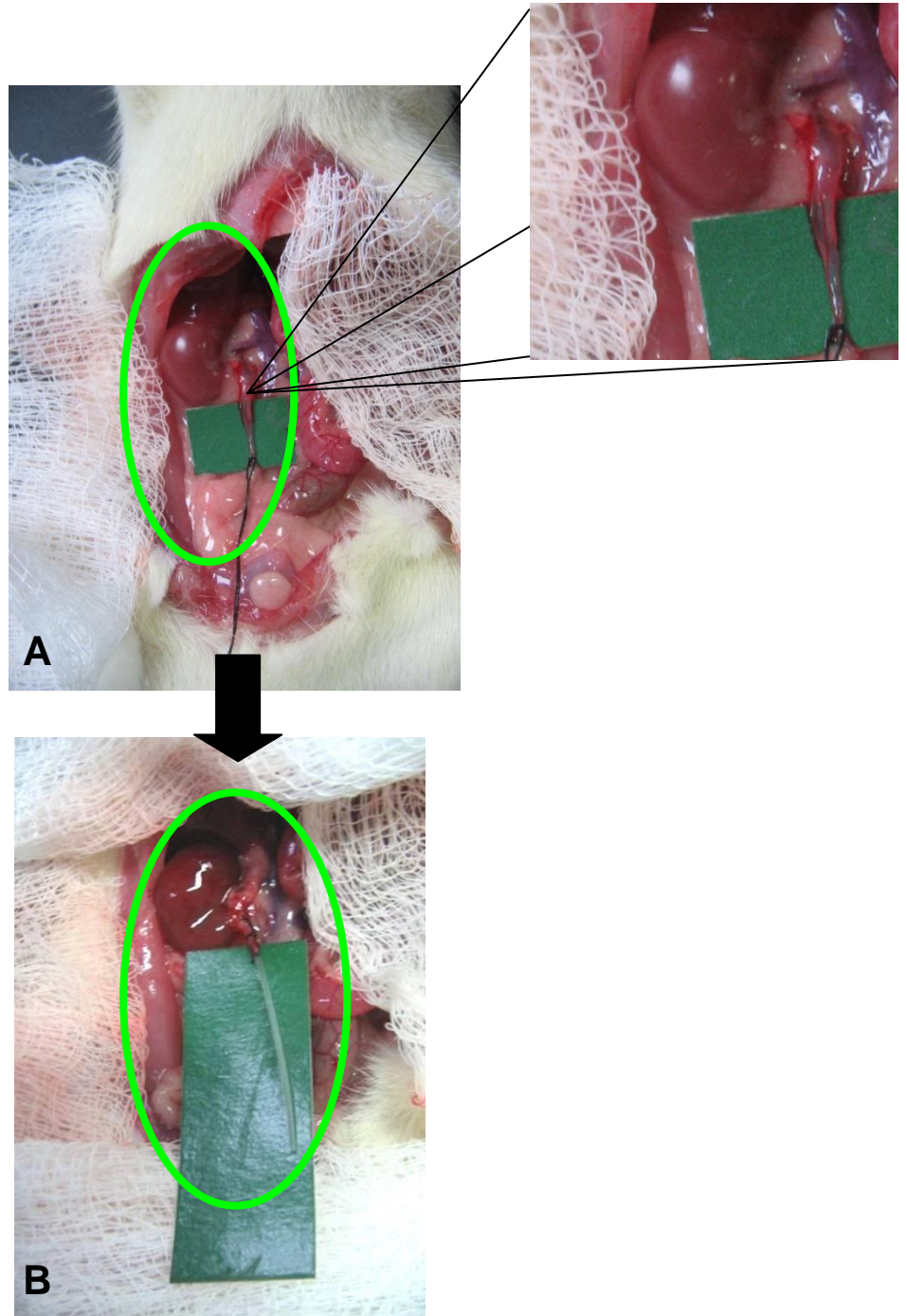


**Figura 11.** Administração de manitol (300mg/3mL - independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado.

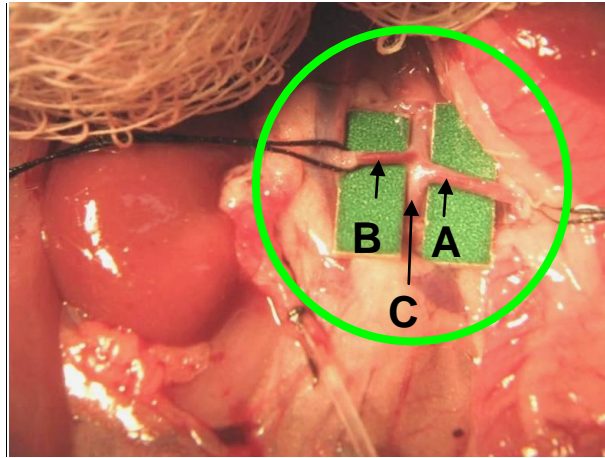


**Figura 12.** Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.

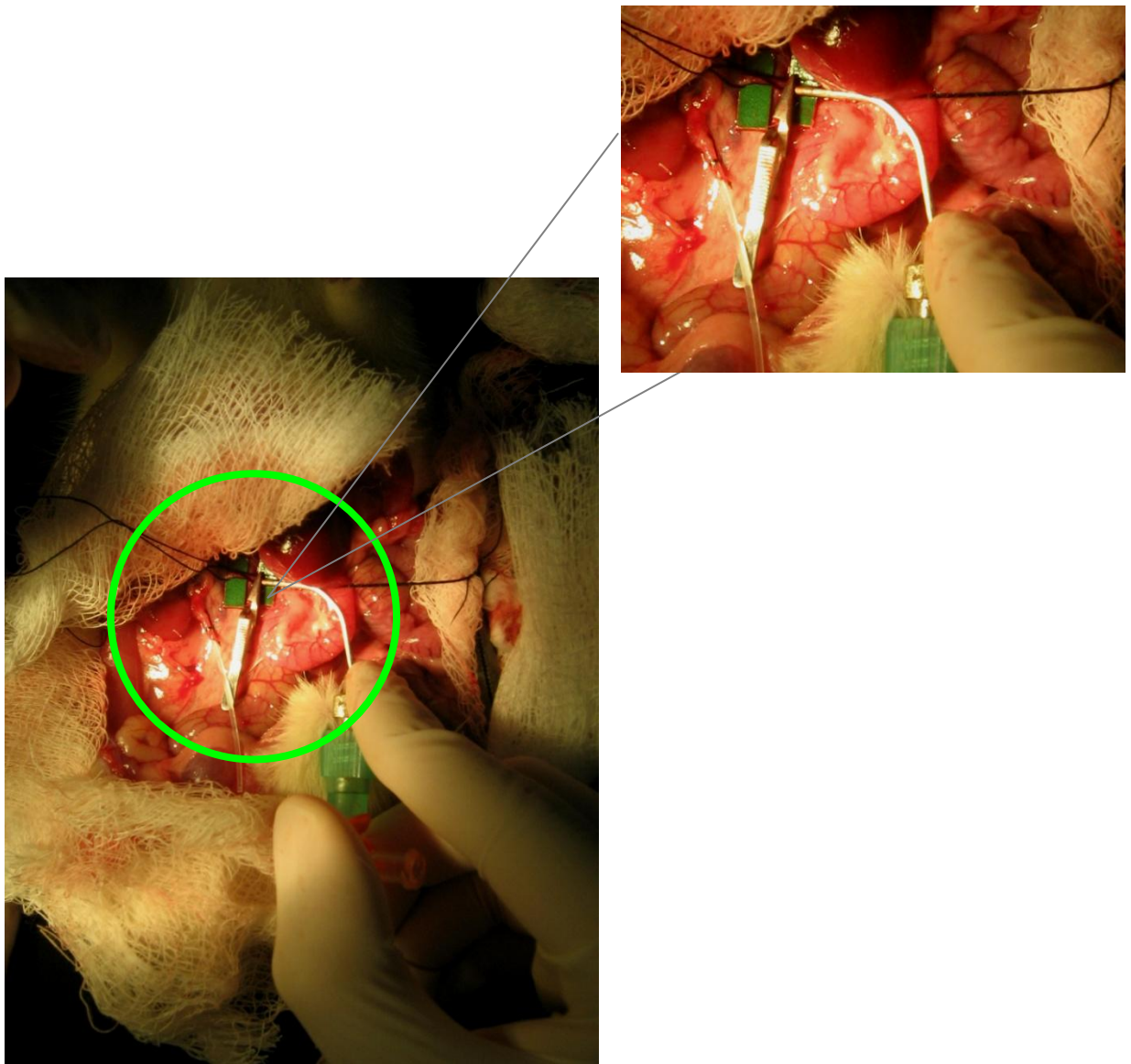
Com uma lupa (aumento de 7 vezes) o ureter foi identificado, dissecado e canulado – tubo de polietileno PE-30 (figura 13), bem como a artéria mesentérica superior, artéria renal (Figura 14) e a glândula supra-renal identificados. O rim direito foi descapsulado e a glândula supra-renal isolada. Outra cânula metálica foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi realizada a fixação da cânula (figura 15).



**Figura 13.** Identificação (A) e canulação (B) do ureter.

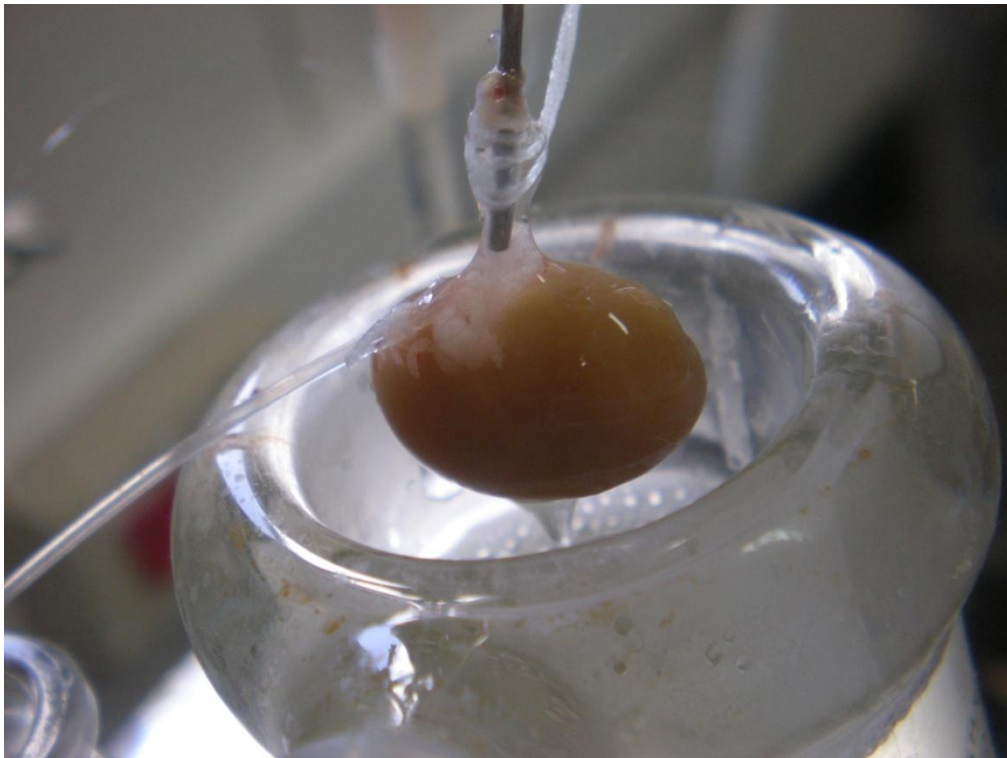


**Figura 14.** Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C).



**Figura 15.** Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim *in vivo*, evitando qualquer isquemia do órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (figura 16).



**Figura 16.** Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.

### 3.4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.4.5.1 VENENO TOTAL

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30min iniciais foram utilizados como controle interno para os experimentos com as três diferentes concentrações do veneno total de *Apis mellifera* e com uma concentração da associação das frações complexada (PLA<sub>2</sub> +melitina) do veneno de *Apis mellifera*. As concentrações utilizadas do veneno total foram 1µg/mL, 3,0µg/mL e 10,0µg/mL e da fração (PLA<sub>2</sub> +melitina) foi 1,8µg/mL. A cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min. Amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos. Depois, as amostras foram congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, fundamentais para os cálculos dos parâmetros da função renal (Fonteles *et al*, 1983).

#### 3.4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Nas amostras de urina e perfusato foram realizadas determinações de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem 744 - Bayer<sup>®</sup> diagnóstica). A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser *et al.* (1955) e Fonteles *et al.* (1983), com modificações que reduziram as quantidades de amostras e reagentes utilizados. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foi medida utilizando um osmômetro (WESCOR<sup>®</sup>, modelo Vapro<sup>®</sup> 5520). Esses parâmetros foram determinados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

### 3.5.7 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS RENAIIS AVALIADOS

A figura 17 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais utilizados para obtenção dos valores e dos gráficos utilizados na tese. Os cálculos demonstrados foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

<b>FU</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FU (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo urinário</b></li> <li>• <math>FU = (\text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo}) / 10</math></li> </ul>
<b>PP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PP (mmHg) = Pressão de perfusão</b></li> <li>• Leitura em manômetro</li> </ul>
<b>RFG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RFG (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Ritmo de filtração glomerular</b></li> <li>• <math>RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in} \times FU)</math> sendo DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato</li> </ul>
<b>FPR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FPR (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Fluxo de perfusão renal</b></li> <li>• Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)</li> </ul>
<b>RVR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RVR (mmHg.mL<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Resistência vascular renal</b></li> <li>• <math>RVR = PP \text{ (mmHg)} / FPR</math></li> </ul>
<b>FNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio filtrado</b></li> <li>• <math>FNa^+ = RFG \times PNa^+</math> (PNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio no perfusato)</li> </ul>
<b>ENa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio excretado</b></li> <li>• <math>ENa^+ = FU \times UNa^+</math> (UNa<sup>+</sup> = Concentração de sódio na urina)</li> </ul>
<b>TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TNa<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Sódio transportado</b></li> <li>• <math>TNa^+ = FNa^+ - ENa^+</math></li> </ul>
<b>%TNa<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TNa<sup>+</sup> = Percentual de transporte de sódio transportado</b></li> <li>• <math>\%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+</math></li> </ul>
<b>FK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio filtrado</b></li> <li>• <math>FK^+ = RFG \times PK^+</math> (PK<sup>+</sup> = concentração de potássio no perfusato)</li> </ul>
<b>EK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio excretado</b></li> <li>• <math>EK^+ = FU \times UK^+</math> (UK<sup>+</sup> = Concentração de potássio na urina)</li> </ul>
<b>TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TK<sup>+</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Potássio transportado</b></li> <li>• <math>TK^+ = FK^+ - EK^+</math></li> </ul>
<b>%TK<sup>+</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TK<sup>+</sup> = Percentual de transporte de potássio</b></li> <li>• <math>\%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+</math></li> </ul>
<b>FCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto filtrado</b></li> <li>• <math>FCl^- = RFG \times PCl^-</math> (PCl<sup>-</sup> = Concentração de cloreto no perfusato)</li> </ul>
<b>ECl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ECl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto excretado</b></li> <li>• <math>ECl^- = FU \times UCl^-</math> (UCl<sup>-</sup> = Concentração de cloreto na urina)</li> </ul>
<b>TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TCl<sup>-</sup> (μEq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) = Cloreto transportado</b></li> <li>• <math>TCl^- = FCl^- - ECl^-</math></li> </ul>
<b>%TCl<sup>-</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>%TCl<sup>-</sup> = Percentual de transporte de cloreto</b></li> <li>• <math>\%TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-</math></li> </ul>

**Figura 17.** Cálculos para determinação de parâmetros funcionais renais estudados (em azul).

Cada um desses parâmetros permite fazer inferência a diversos efeitos. A PP indica se a substância ou a toxina na qual se está testando é capaz de modificar as forças que regem a perfusão renal. Em relação à RVR, esse parâmetro possibilita investigar se as alterações na PP estão relacionadas à contração ou relaxamento dos vasos que irrigam o tecido renal. O FU permite observar se o tecido renal está produzindo um volume de urina maior ou menor. Em relação ao RFG, verifica-se se a depuração ou *clearance* aumentou, através de marcadores como a inulina. O percentual de transporte tubular (total e proximal) permite com que se possam observar possíveis alterações tubulares em relação ao aumento ou redução da reabsorção/excreção de eletrólitos, verificando a manutenção da função tubular. O *clearance* osmótico, por sua vez, verifica como o rim está depurando substâncias osmoticamente ativas e se essas estão sendo eliminadas em maior ou menor quantidade na urina. Todos esses parâmetros da fisiologia renal, associados à análise histológica, permitem verificar possíveis mecanismos de manutenção/alteração da função renal.

#### **3.4.8 ESTUDO HISTOLÓGICO RENAL**

Ao final de cada experimento foi retirado um fragmento longitudinal pegando córtex e medula do rim perfundido (direito) e não perfundido (esquerdo) sendo colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização, e, em seguida, cortados em uma espessura de 5 $\mu$ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de microscopia de luz (NIKON<sup>®</sup>). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido – controle externo). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolt E3030<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).

### **3.5 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS**

#### **3.5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS MDCK (MADIN-DARBY CANINE KIDNEY)**

Para investigar se o veneno estudado possui citotoxicidade em células de túbulos renais, utilizaram-se culturas de células epiteliais de túbulos de cães (Madin-Darby Canine Kidney - MDCK). Essas células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm<sup>2</sup>), utilizando o meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup>) a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

#### **3.5.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE**

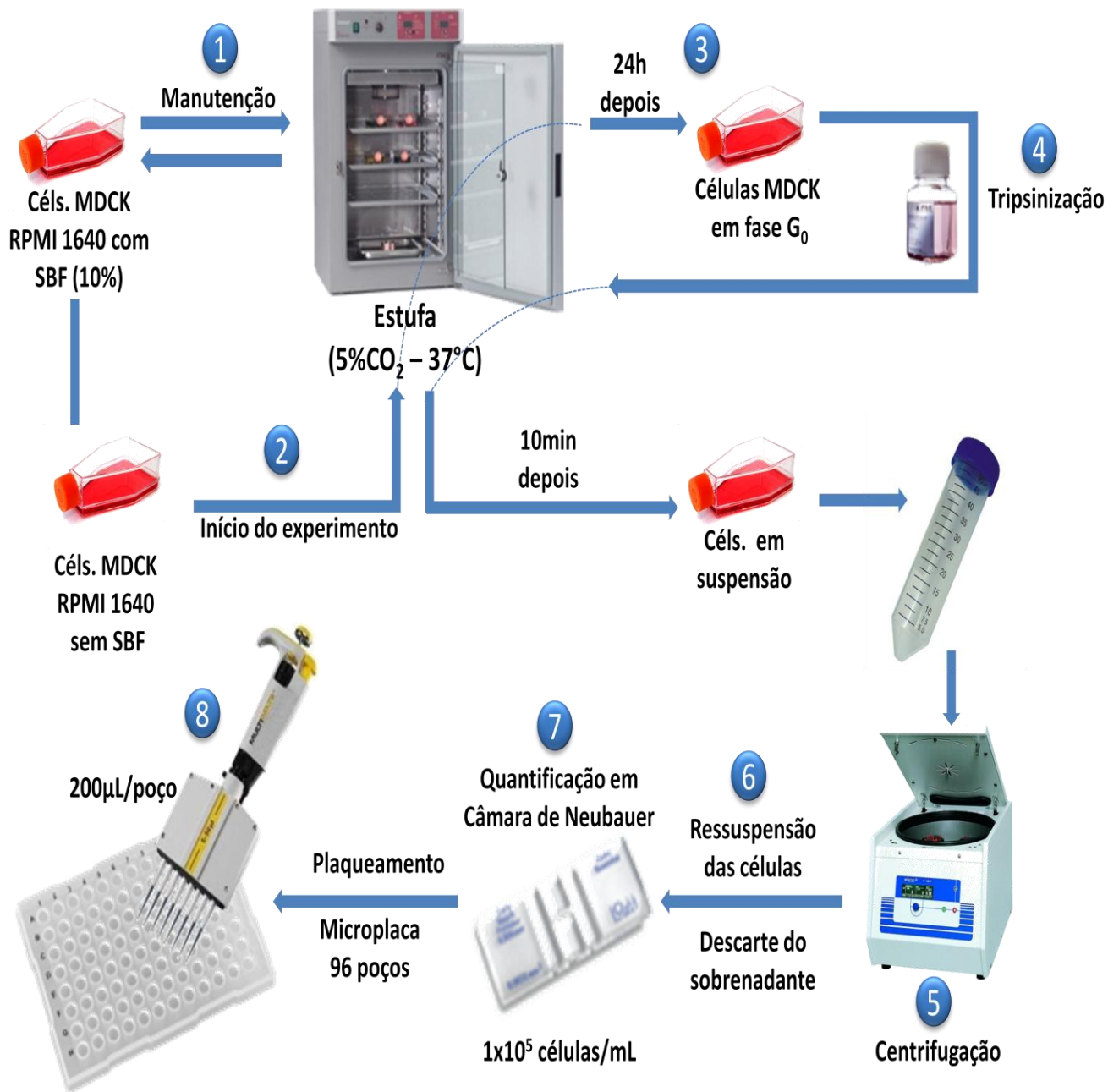
O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan (produto de cor púrpura insolúvel em água), pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar o percentual de células vivas. Assim, pode-se verificar a capacidade do veneno de destruir as células MDCK, uma vez que células viáveis são capazes de formar o formazan. A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra.

Para realização do ensaio com sal de tetrazolium (MTT), as células MDCK foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal (SBF) por 24 horas para sincronizá-las na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) e ficaram em contato com esse reagente por aproximadamente 10min em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Depois de suspensas em meio de cultura com 10% de SFB, realizou-se

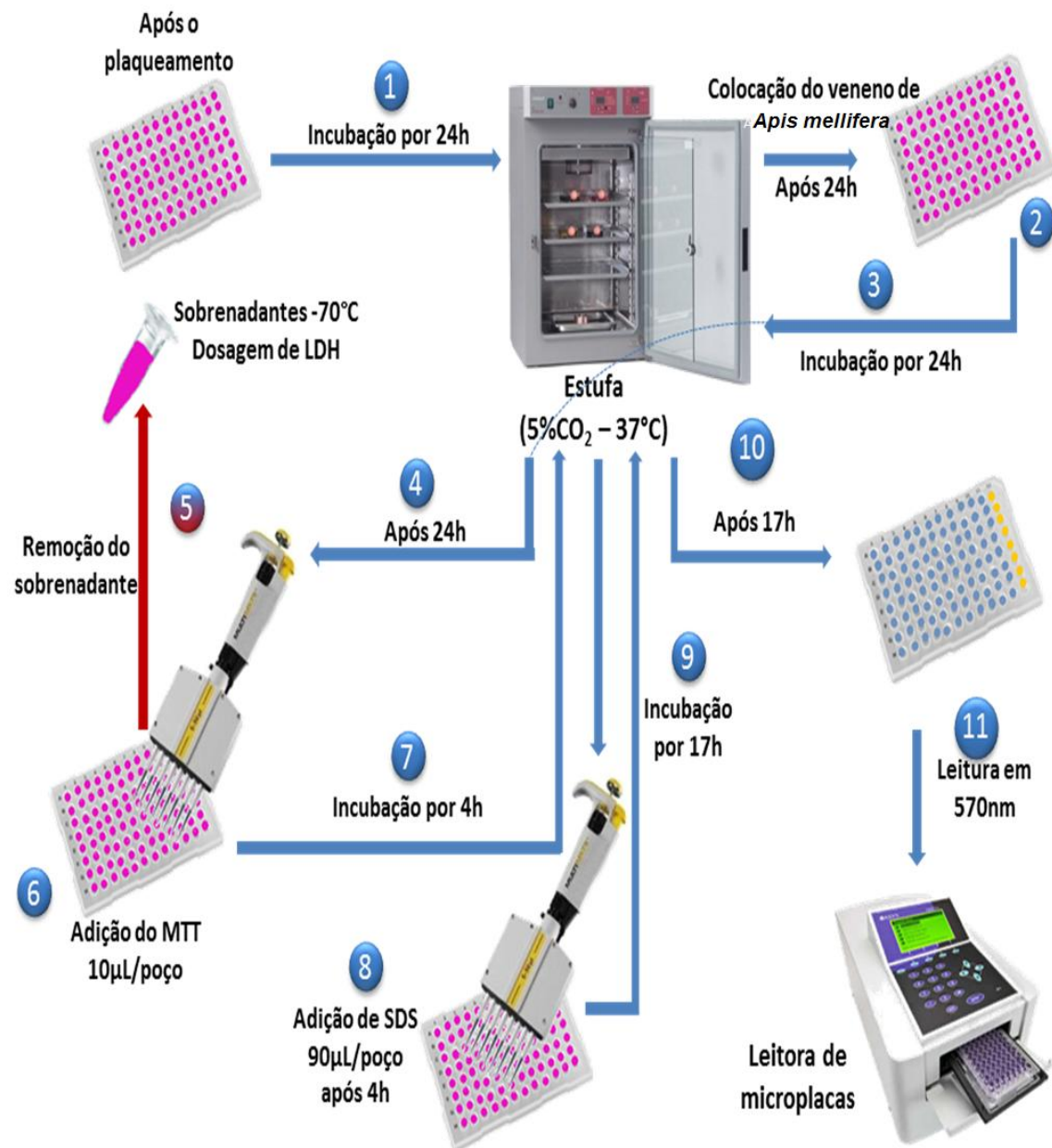
centrifugação por 5min a 4.000rpm, re-suspensão e quantificação das células em câmara de Neubauer, utilizando coloração com azul de trypan. Conhecido o número de células por mL, as mesmas foram transferidas (200µL -  $1 \times 10^5$  células/mL) para placas de 96 poços (figura 18). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionadas diferentes concentrações do veneno total de *Apis mellifera* – 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/ML. Como controle negativo, foi utilizado tampão fosfato (PBS - *phosphate buffer solution*) estéril com pH 7,4.

Após nova incubação por 24 horas nas mesmas condições descritas, removeu-se 100µL do sobrenadante do meio de cultura, que foi armazenado em freezer a -70°C para determinação da enzima lactato desidrogenase (LDH), segundo indicações do fabricante (Labtest® - equipamento semi-automático Labquest®) - quando aumentada a atividade da enzima LDH, há indícios de extravasamento e lesão da membrana celular, permitindo verificar o tipo de dano que a célula sofreu (dano direto e/ou apoptose). Ao volume restante ainda presente na placa, adicionou-se 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT) dissolvido em PBS. Após incubação por 4 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, adicionou-se 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. Novamente as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C por mais 17 horas. Após esse último procedimento, realizou-se a leitura da absorbância de cada poço da placa com comprimento de onda de 570nm em uma leitora de microplacas ASYS® Expert Plus® (figura 19).

Foram realizados os experimentos de forma independente (n=3) e em triplicada para cada concentração. Controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas nesse grupo e nos demais grupos tratados com veneno (MOSMANN, 1983). Fotomicrografias foram realizadas para documentar os aspectos morfológicos celulares dos grupos estudados através do microscópio Olympus® CKX 41® com câmera digital acoplada (Evolt E330® Olympus®).



**Figura 18.** Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney). (SOUSA, 2010).



**Figura 19.** Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney). (SOUSA, 2010).

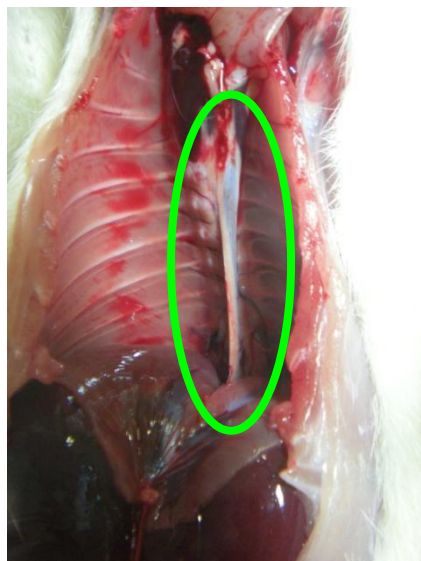
### 3.6 ANEL DE AORTA

#### 3.6.1 TÉCNICA CIRÚRGICA

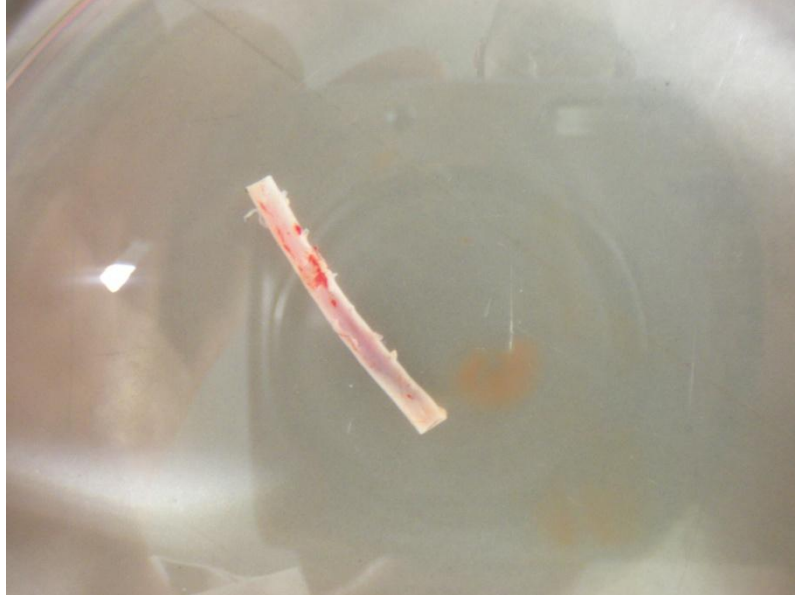
A avaliação dos efeitos vasculares do veneno de *Apis mellifera* em vasos de condutância foi realizada através dos ensaios em anel de aorta isolado de ratos Wistar machos (n=4).

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Depois da realização de incisão no tórax do animal foram extirpados os pulmões e o coração para visualização do segmento torácico da aorta (figura 20).

Após o procedimento cirúrgico, o segmento da aorta torácica foi removido (figura 21) e cortado transversalmente em anéis cilíndricos (1mm x 5mm) que foram acoplados em peças triangulares de aço ligadas a um fio (figura 22). As preparações foram suspensas horizontalmente em cubas de volume de 5mL para órgãos isolados contendo solução de Tyrode modificada (figura 23) com a seguinte composição, em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5 (pH 7,4 - mantida a 37°C). Os tecidos foram mantidos em uma tensão basal de 1g na cuba com a solução devidamente aerada.



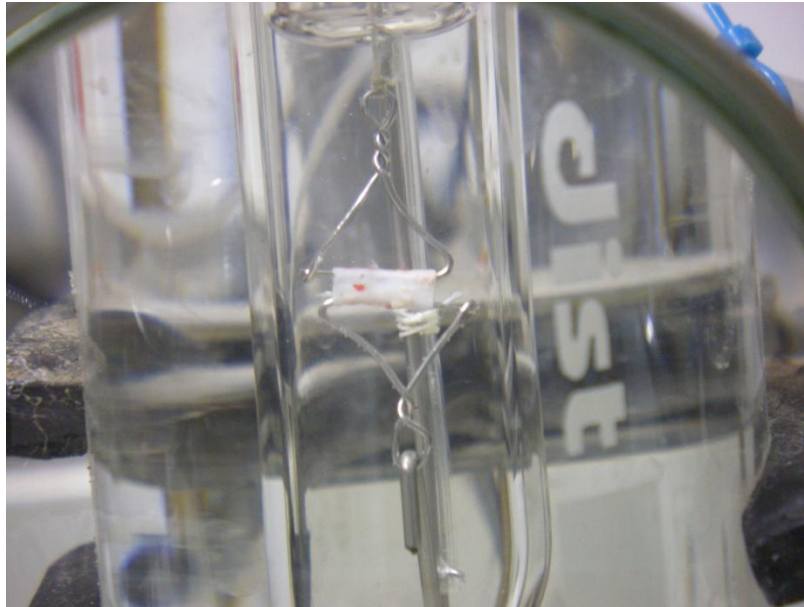
**Figura 20.** Visualização do segmento torácico da aorta no animal dissecado.



**Figura 21.** Segmento da aorta torácica isolada e devidamente dissecado.

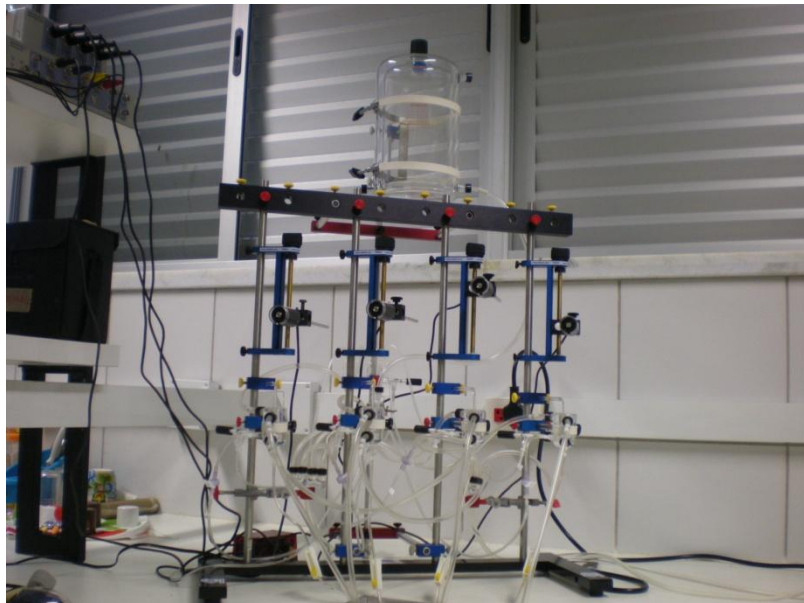


**Figura 22.** Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares.

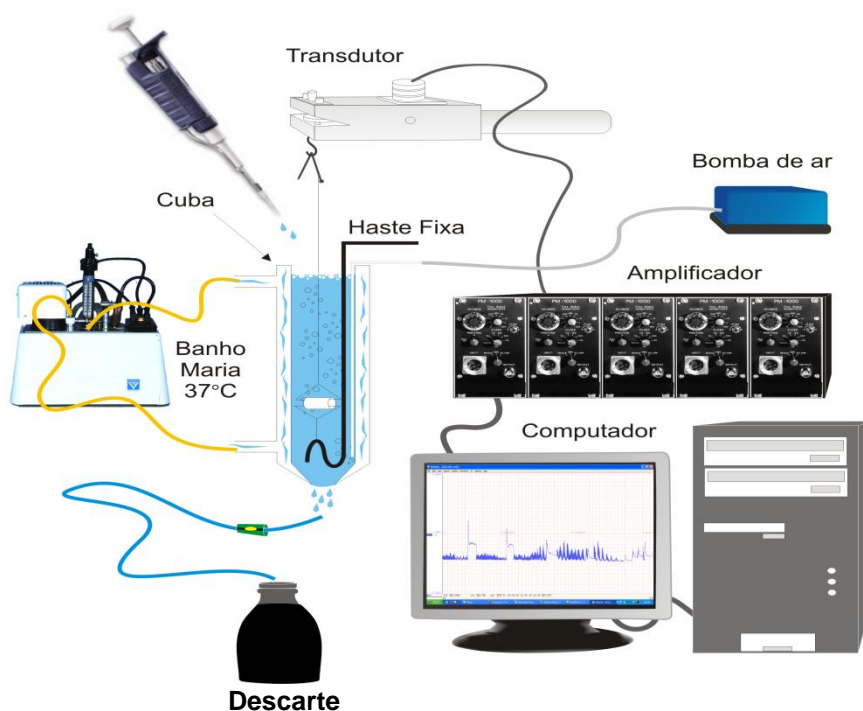


**Figura 23.** Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada.

As contrações foram registradas isometricamente por transdutores de força, conectados a um sistema de aquisição de dados (Dataq® PM-1000, EUA, figuras 24 e 25).



**Figura 24.** Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato. *Fonte:* Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso



**Figura 25.** Desenho esquemático do sistema utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso. (Figura elaborada por David Matthews Jucá).

Após período de estabilização do tecido no sistema (aproximadamente 60 minutos), contrações foram induzidas por adição de potássio 60mM em três curvas adotadas como controle (teste da viabilidade do tecido).

### 3.6.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram realizados protocolos experimentais, nos quais foram utilizadas várias concentrações (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu$ g/mL), do veneno total e das frações da *Apis mellifera*.

Esses protocolos são descritos a seguir:

### **3.6.2.1 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL**

O efeito na tensão basal do músculo liso vascular com o endotélio intacto foi avaliado através da exposição dos anéis as concentrações crescentes do veneno.

### **3.6.2.2 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* EM MEIO LIVRE DE CÁLCIO NA PRESENÇA DE EGTA (ETILENO GLICOL TETRACÉTICO)**

Buscando analisar a influência do cálcio intracelular no efeito do veneno sobre os anéis de aorta, foram realizados ensaios em meio ausente de cálcio. Após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, em meio com solução de Tyrode normal, as preparações foram lavadas três vezes por três minutos com solução de Tyrode ausente de  $\text{CaCl}_2$  e adicionado o agente quelante EGTA (1mM), garantindo a total retirada de cálcio do meio extracelular, seguida da adição do veneno.

### **3.6.2.3 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* EM MEIO COM FENTOLAMINA, VERAPAMIL, LOSARTAN E INIBIDOR DE FOSFOLIPASE C (U-73122)**

Para verificar um provável mecanismo mediador da ação vascular do veneno, foram realizados ensaios em anéis de aorta com a administração de um bloqueador operador de voltagem (Verapamil  $10\mu\text{M}$ ; n=05), um antagonista  $\alpha$ -adrenérgico (Fentolamina  $5\mu\text{M}$ ; n=05), um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II (Losartan  $100\mu\text{M}$ ; n=05), um inibidor de fosfolipase C (U-73122  $10\mu\text{M}$ ; n=05), após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, seguida da adição do veneno.

### 3.6.2.3 EFEITO DAS FRAÇÕES PLA<sub>2</sub> E MELITINA ISOLADOS, E EFEITO DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + MELITINA) DO VENENO DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL

O efeito na tensão basal do músculo liso vascular com o endotélio intacto foi avaliado através da exposição dos anéis as concentrações crescentes das frações isoladas de PLA<sub>2</sub> e melitina e da fração complexada (PLA<sub>2</sub>+melitina) do veneno na tentativa de elucidar qual era o peptídeo responsável pelo efeito.

### 3.7.3 ESTUDO HISTOLÓGICO DOS ANEIS DE AORTA

Ao final de cada experimento, os segmentos de anel de aorta submetidos aos protocolos experimentais descritos anteriormente foram colocados em formol a 10% por pelo menos 24h para posterior análise histológica.

Após isso, os anéis de aorta foram desidratados e diafanizados e, em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (NIKON). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> CKX 41<sup>®</sup> com câmera digital acoplada (Evolt E330<sup>®</sup> Olympus<sup>®</sup>).

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram expressos na forma de média ± erro padrão da média e a diferenças estatísticas entre os grupos estudados verificada pelo teste *t* de *Student* (pareado e não pareado) e análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey ou Holm-Sidak (múltipla comparação entre os grupos). A análise estatística foi realizada utilizando-se os *softwares* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>, Sigma Plot 11<sup>®</sup> e GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

### **3.9 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os procedimentos adotados para a realização dos protocolos experimentais descritos estão de acordo com os preceitos éticos adotados pela comunidade científica nacional e internacional. Os protocolos experimentais também foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará com o número 01/2012, conforme anexo 2.

# RESULTADOS

*Eu não procuro saber as respostas, procuro compreender as perguntas.*

*Confúcio*

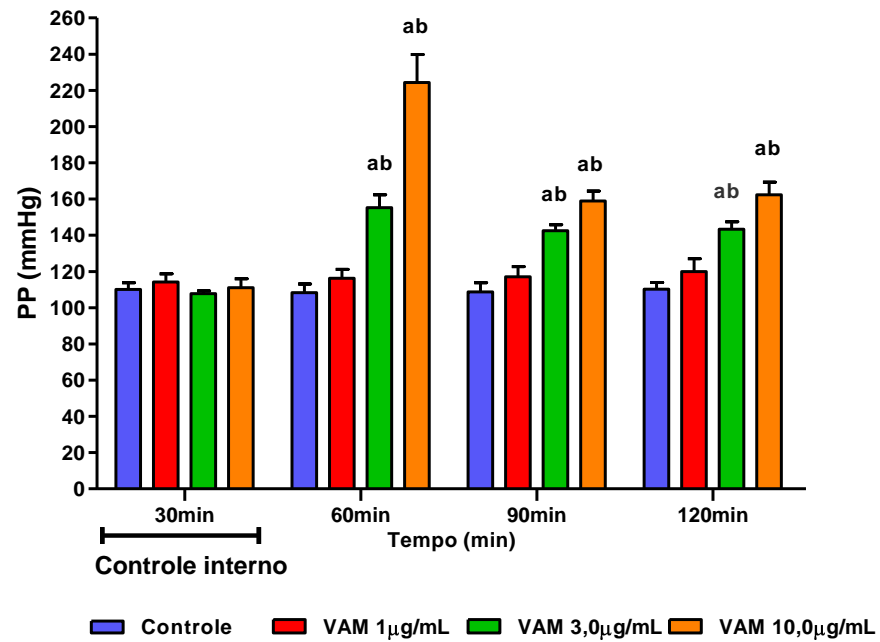
## 4 RESULTADOS

### 4.1 PERFUSÃO RENAL

#### 4.1.1 PERFUSÃO RENAL DO VENENO TOTAL

De acordo com os experimentos realizados com o veneno total de *Apis mellifera*, nas técnicas de perfusão, verificou-se que a função renal é afetada em todos os parâmetros estudados em duas das concentrações testadas.

Em termos de pressão de perfusão (PP), observou-se que houve aumento significativo desse parâmetro aos 60min com as concentrações de 3 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL. Na concentração de 3,0 $\mu$ g/mL, a PP foi mantida significativamente aos 90 e 120min. Na maior concentração (10,0 $\mu$ g/mL) ocorreu uma redução aos 90 e 120min, no entanto, sendo significativo em relação aos controles (figura 26 e tabela 1).



**Figura 26.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) na pressão de perfusão renal (PP). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0 µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

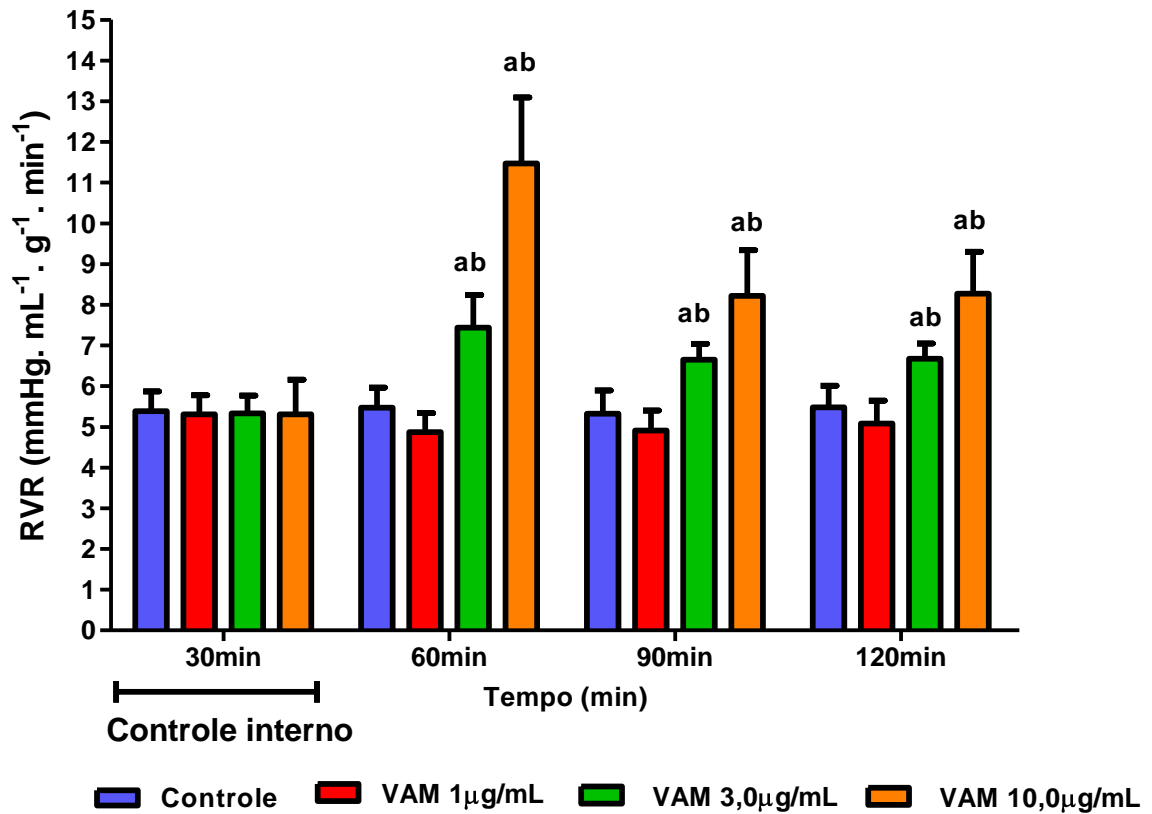
**Tabela 1.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	110,10	3,68	114,20	4,53	107,80	1,40	111,00	4,98
60	108,27	4,88	116,20	5,01	155,20 <sup>ab</sup>	7,20	224,3 <sup>ab</sup>	15,45
90	108,69	5,08	117,10	5,56	142,50 <sup>ab</sup>	3,30	158,68 <sup>ab</sup>	5,51
120	110,28	3,69	120,00	6,99	143,30 <sup>ab</sup>	4,20	162,3 <sup>ab</sup>	5,51

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

A resistência vascular renal (RVR) também se mostrou aumentada a partir dos 60min quando o rim foi perfundido com VAM nas concentrações de 3µg/mL e 10µg/mL. O VAM, na concentração de 10,0µg/mL promoveu uma redução desse parâmetro aos 90 e 120min, no entanto, essa redução ainda foi significativa quando comparada aos controles internos e externos.

Essas alterações podem ser observadas na figura 27 e na tabela 2, apresentadas a seguir.



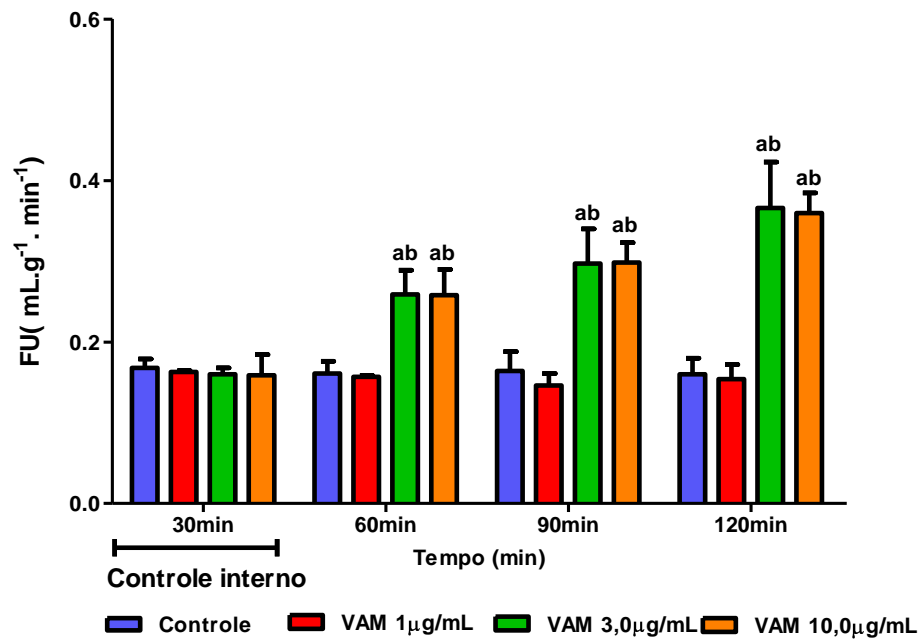
**Figura 27.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) na resistência vascular renal (RVR). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0μg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 2.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	5,31	0,47	5,33	0,44	5,81	0,85
60	5,47	0,49	4,87	0,47	7,44 <sup>ab</sup>	0,80	11,47 <sup>ab</sup>	1,62
90	5,32	0,57	4,91	0,49	6,65 <sup>ab</sup>	0,39	8,22 <sup>ab</sup>	1,12
120	5,48	0,53	5,08	0,56	6,67 <sup>ab</sup>	0,38	8,27 <sup>ab</sup>	1,03

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

O fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), também foram alterados pelo VAM. O FU foi aumentado aos 60min e manteve-se até 120min nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL, esse aumento permaneceu significativo tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle (figura 28 e tabela 3). Em comparação ao FU que aos 60min verificou-se um aumento significativo em relação aos controles interno e externo o RFG acompanhou esse crescimento apenas aos 90min, valendo ressaltar que essa crescente foi verificada apenas nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL, sendo esse perfil de alteração permanecido até aos 120min para o RFG (figura 29 e tabela 4).

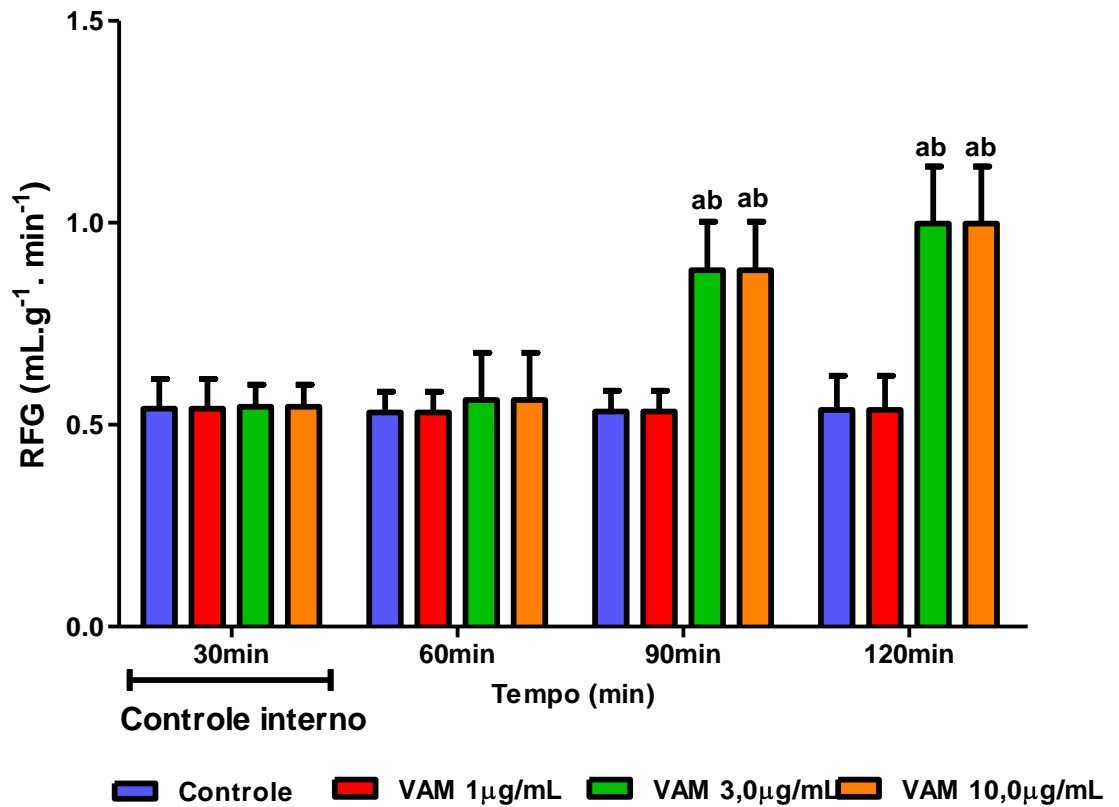


**Figura 28.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no fluxo urinário (FU). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 3.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>30</b>	0,168	0,011	0,1430	0,0013	0,1569	0,008	0,1488	0,0254
<b>60</b>	0,161	0,015	0,1570	0,0014	0,2590 <sup>ab</sup>	0,030	0,1800 <sup>ab</sup>	0,0320
<b>90</b>	0,164	0,024	0,1460	0,0151	0,2970 <sup>ab</sup>	0,0430	0,2985 <sup>ab</sup>	0,0244
<b>120</b>	0,160	0,020	0,1540	0,0180	0,3760 <sup>ab</sup>	0,0570	0,3598 <sup>ab</sup>	0,2485

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 29.** Efeitos do veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

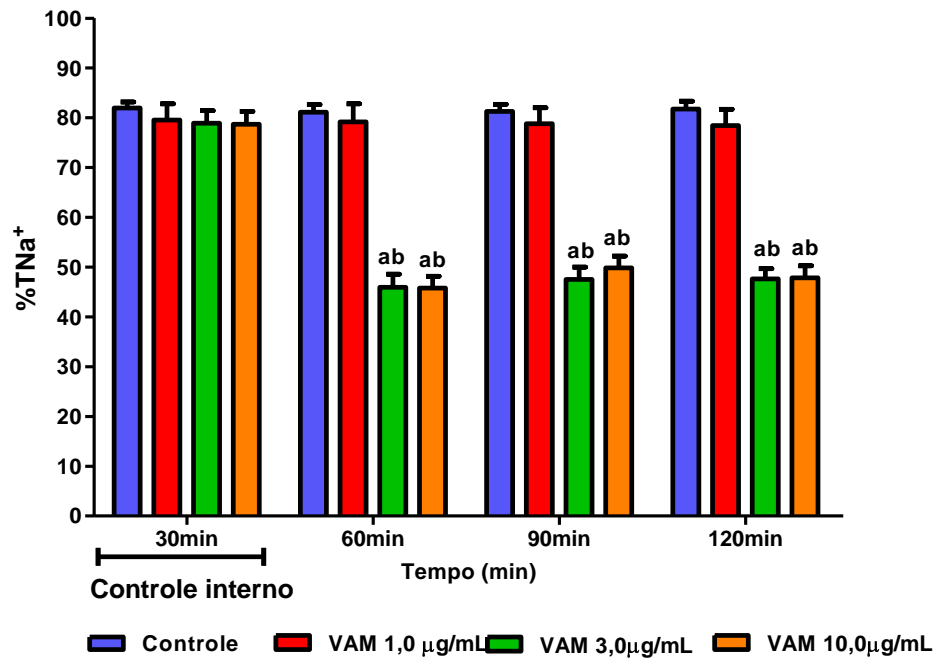
**Tabela 4.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,5359	0,1093	0,599	0,0540	0,5678	0,1370
60	0,707	0,051	0,5180	0,0633	0,561	0,1170	0,5872	0,1049
90	0,633	0,051	0,5580	0,0557	0,673 <sup>ab</sup>	0,1600	0,5358 <sup>ab</sup>	0,0574
120	0,697	0,084	0,6264	0,0940	0,794 <sup>ab</sup>	0,1810	0,5618 <sup>ab</sup>	0,5551

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Os transportes de eletrólitos também foram bastante alterados. O veneno nas concentrações de 3 e 10,0µg/mL levou a alterações nos tempos de 60, 90 e 120min nos rins perfundido com o VAM.

O percentual de transporte de Na<sup>+</sup> (%TNa<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> (%TK<sup>+</sup>) e Cl<sup>-</sup> (%TCl<sup>-</sup>), nas concentrações de 3µg/mL e 10,0µg/mL reduziu significativamente esse parâmetro nos três tempos (60, 90 e 120min) em relação aos controles interno e externo, assim como demonstrado nas figuras 30, 31 e 32, além das tabelas 5, 6 e 7.

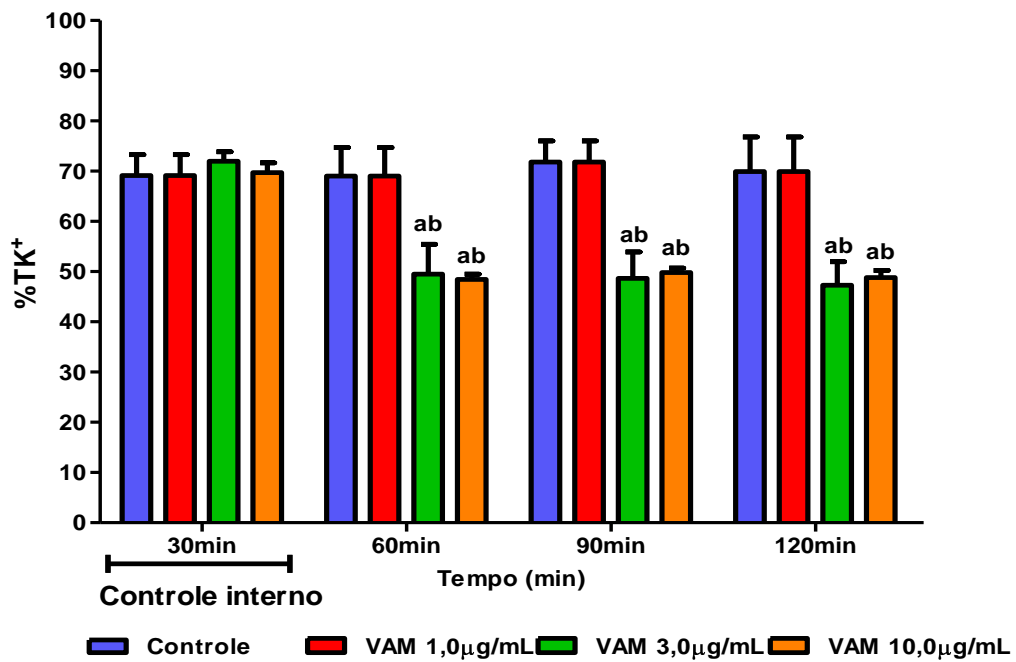


**Figura 30.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VBL (1; 3,0 e 10,0 µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 5.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	79,55	3,28	78,89	2,57	78,71	2,57
60	81,11	1,52	79,15	3,66	45,95 <sup>ab</sup>	2,64	45,77 <sup>ab</sup>	2,39
90	81,26	1,45	78,78	3,22	47,55 <sup>ab</sup>	2,46	49,83 <sup>ab</sup>	2,39
120	81,76	1,56	78,41	3,27	47,62 <sup>ab</sup>	2,09	47,85 <sup>ab</sup>	2,40

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

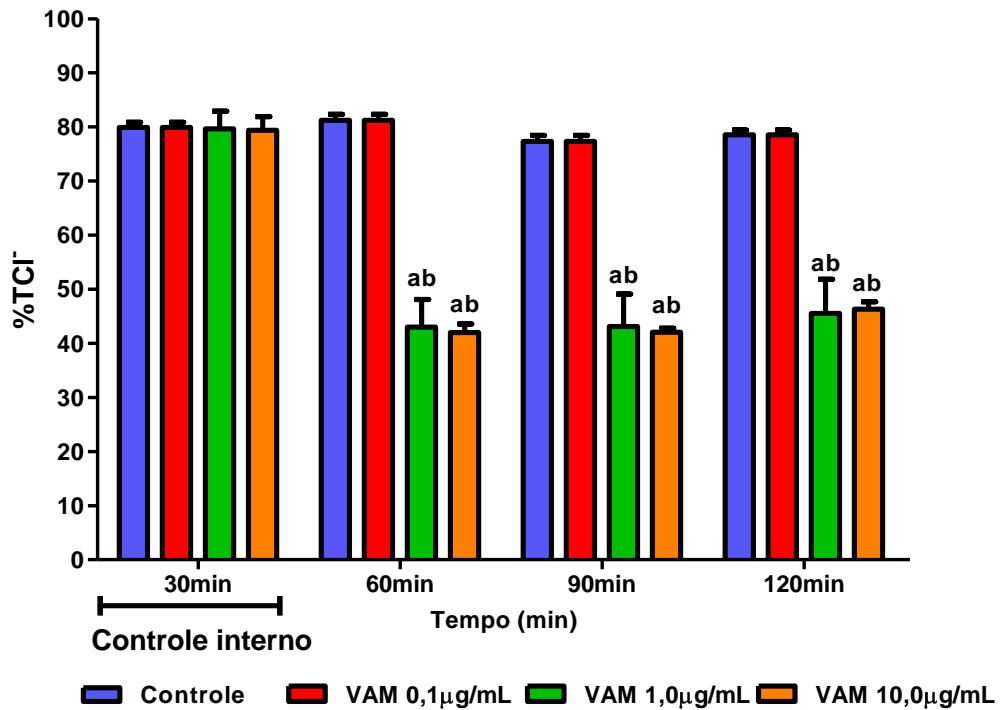


**Figura 31.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 6.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM).

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1,0µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>30</b>	69,13	4,14	69,53	4,74	71,95	1,94	69,73	1,94
<b>60</b>	69,04	5,68	69,54	5,18	49,49 <sup>ab</sup>	5,94	48,44 <sup>ab</sup>	1,08
<b>90</b>	71,84	4,21	71,34	4,71	48,65 <sup>ab</sup>	5,28	49,84 <sup>ab</sup>	0,87
<b>120</b>	69,94	6,86	69,24	6,26	47,29 <sup>ab</sup>	4,69	48,82 <sup>ab</sup>	1,42

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 32.** Efeitos do veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) no percentual de transporte de cloreto (%TCI<sup>-</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1; 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle interno e “b” significa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 7.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com o veneno total da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados							
	Grupo controle		VAM 1,0µg/mL		VAM 3,0µg/mL		VAM 10,0µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	0,98	79,40	0,91	79,63	3,30	79,40	2,53
60	81,25	1,06	81,85	1,96	42,97 <sup>ab</sup>	5,14	41,97 <sup>ab</sup>	1,62
90	77,32	1,12	77,92	1,18	43,12 <sup>ab</sup>	6,01	42,04 <sup>ab</sup>	0,73
120	78,53	0,89	78,13	0,19	45,51 <sup>ab</sup>	6,32	46,30 <sup>ab</sup>	1,40

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e VAM (1, 3,0 e 10,0µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

#### 4.1.2 PERFUSÃO RENAL DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + Melitina) DO VENENO DE *Apis mellifera*

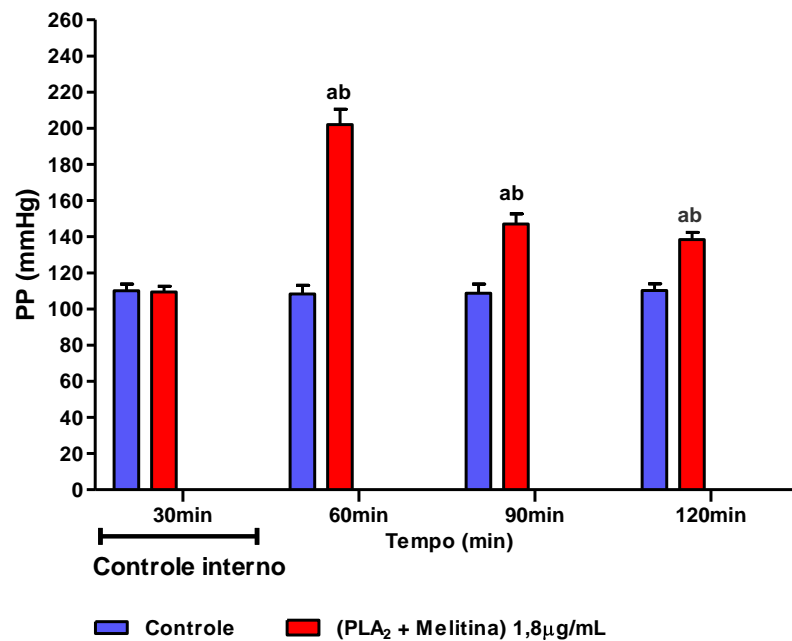
Os experimentos realizados em perfusão renal com o veneno total, nas concentrações de 3 e 10µg/mL do veneno alterou significativamente todos os parâmetros renais.

De acordo com dados na literatura, o complexo da fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina) do veneno de *Apis mellifera*, representa em torno de 60% do veneno total, desta forma, fazendo o cálculo proporcional, 1,8µg/mL do complexo de fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina) representam 3µg/mL do veneno total.

Verificou-se que a função renal é afetada em todos os parâmetros estudados. Em termos de pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR), observou-se que houve aumento significativo desses parâmetros aos 60min, ocorreu uma redução tanto da PP e RVR aos 90 e 120min, no entanto, sendo significativo em relação aos controles interno e externo, conforme figuras 33 e 34 e tabelas 8 e 9.

O fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), também foram alterados pelo complexo de fração (PLA<sub>2</sub>+ Melitina). O FU foi aumentado aos 60min e manteve-se até 120min, esse aumento permaneceu significativo tanto em relação ao controle interno quanto em relação ao grupo controle (figura 35 e tabela 10). Em comparação ao FU que aos 60min verificou-se um aumento significativo em relação aos controles, o RFG acompanhou esse crescimento apenas aos 90min, valendo ressaltar que esse perfil de alteração permaneceu até aos 120min para o RFG (figura 36 e tabela 11).

Os transportes de eletrólitos também foram bastante alterados. O percentual de transporte de Na<sup>+</sup> (%TNa<sup>+</sup>), K<sup>+</sup> (%TK<sup>+</sup>) e Cl<sup>-</sup> (%TCl<sup>-</sup>), na concentração testada reduziu significativamente esse parâmetro nos três tempos (60, 90 e 120min) em relação aos controles interno e externo, assim como demonstrado nas figuras 37, 38 e 39, além das tabelas 12, 13 e 14.

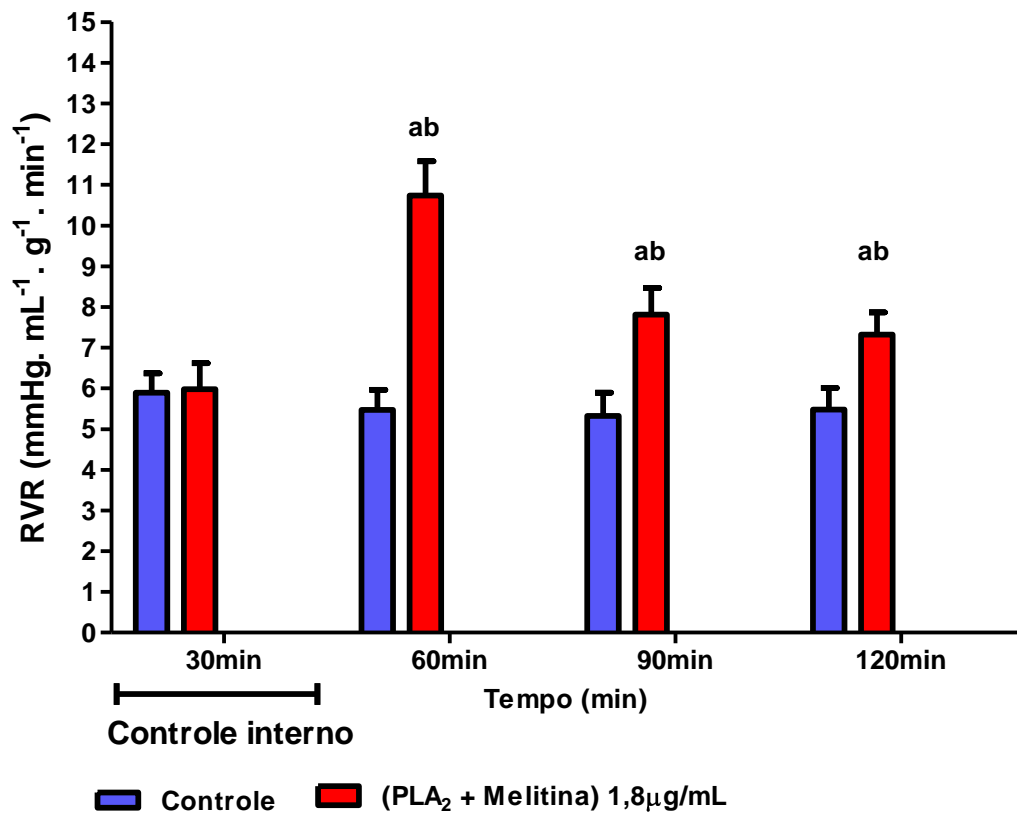


**Figura 33.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na pressão de perfusão renal (PP). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8μg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 8.** Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
<b>30</b>	110,10	3,68	5,13	3,68
<b>60</b>	108,27	4,88	7,44 <sup>ab</sup>	5,88 <sup>ab</sup>
<b>90</b>	108,69	5,08	7,65 <sup>ab</sup>	6,65 <sup>ab</sup>
<b>120</b>	110,28	3,69	7,67 <sup>ab</sup>	6,67 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

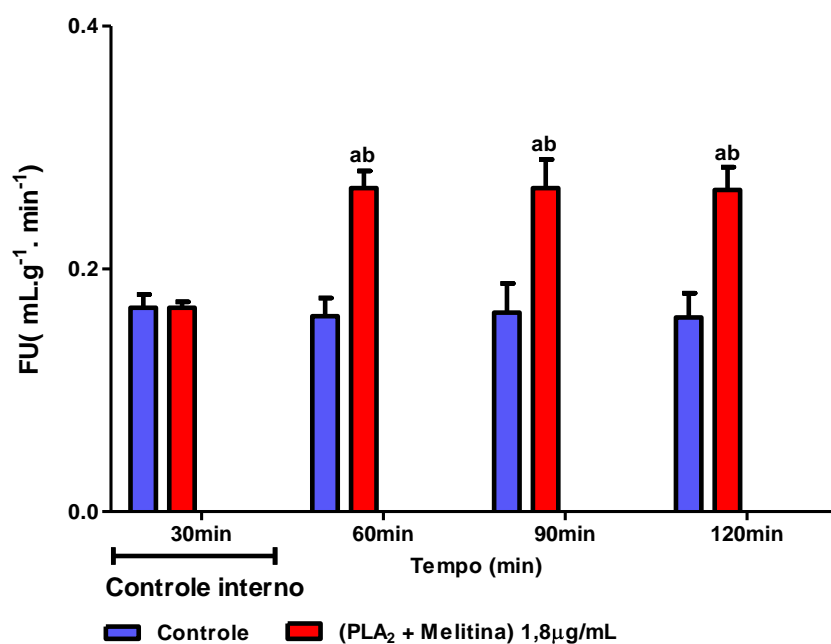


**Figura 34.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* na resistência vascular renal (RVR). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 9.** Valores de resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	5,39	0,48	5,13	0,44
60	5,47	0,49	7,44 <sup>ab</sup>	0,80 <sup>ab</sup>
90	5,32	0,57	7,65 <sup>ab</sup>	0,79 <sup>ab</sup>
120	5,48	0,53	7,67 <sup>ab</sup>	0,78 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

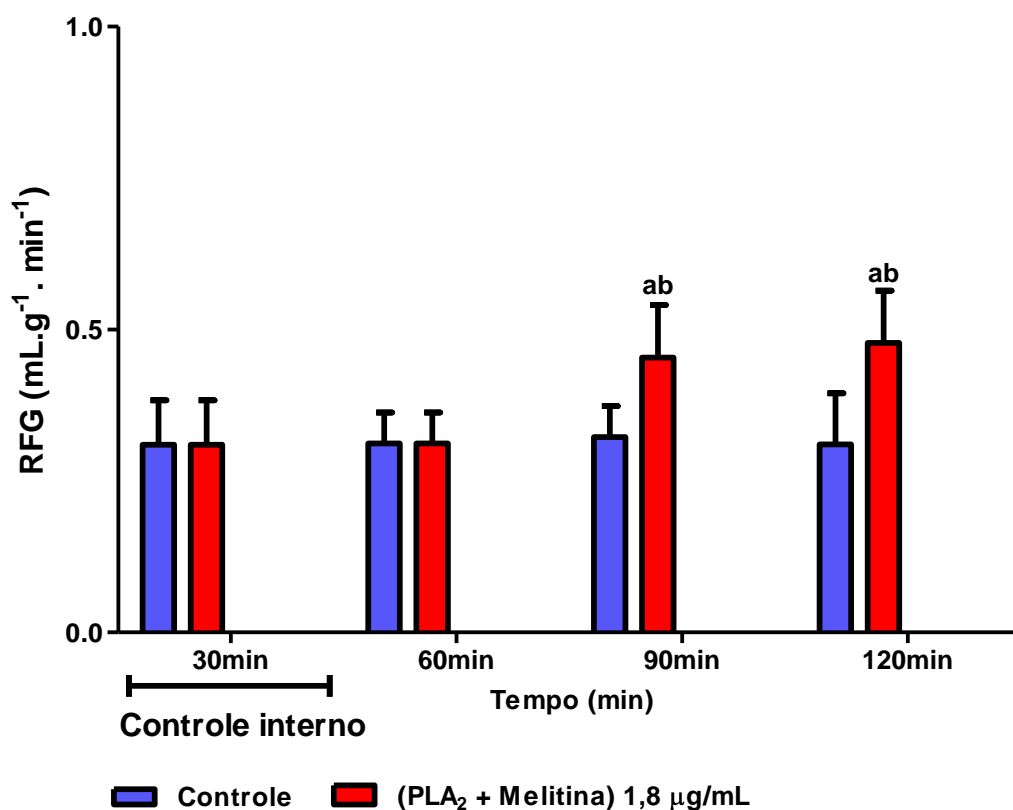


**Figura 35.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* no fluxo urinário (FU). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6 foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 10.** Valores de fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,168	0,011	0,156	0,008
60	0,161	0,015	0,259 <sup>ab</sup>	0,030 <sup>ab</sup>
90	0,164	0,024	0,297 <sup>ab</sup>	0,043 <sup>ab</sup>
120	0,160	0,020	0,376 <sup>ab</sup>	0,057 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

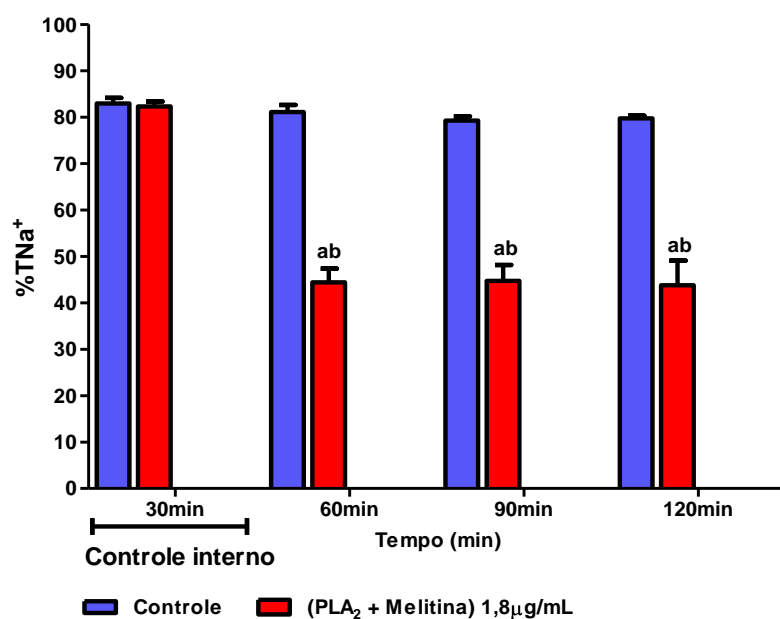


**Figura 36.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera* no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 11.** Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8 µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	0,701	0,073	0,599	0,054
60	0,707	0,051	0,561	0,117
90	0,633	0,051	0,773 <sup>ab</sup>	0,190 <sup>ab</sup>
120	0,697	0,084	0,794 <sup>ab</sup>	0,191 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

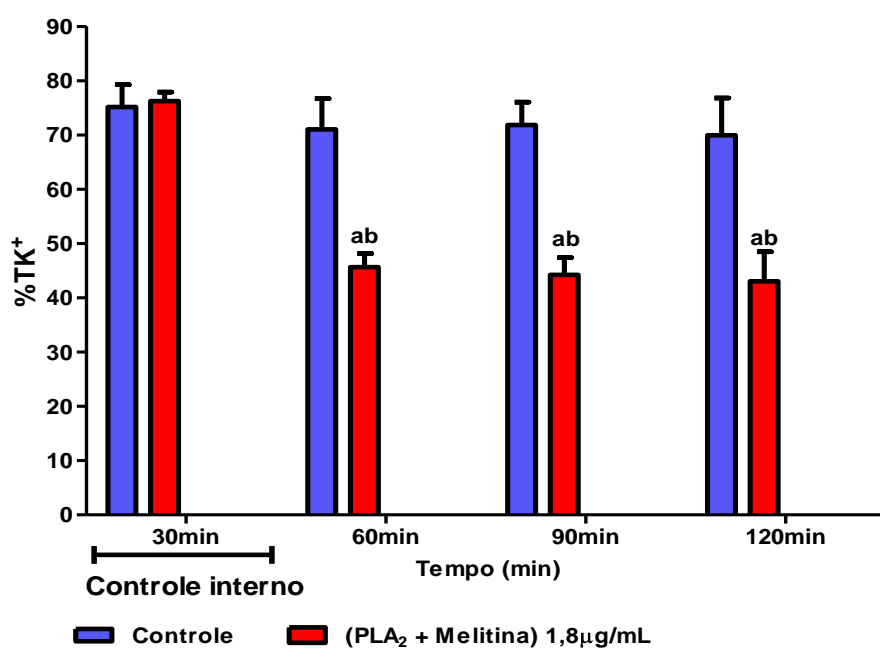


**Figura 37.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 12.** Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	1,24	82,30	1,70
60	81,11	1,52	63,22 <sup>ab</sup>	6,26 <sup>ab</sup>
90	79,26	0,90	51,57 <sup>ab</sup>	5,71 <sup>ab</sup>
120	79,76	0,56	43,73 <sup>ab</sup>	6,29 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

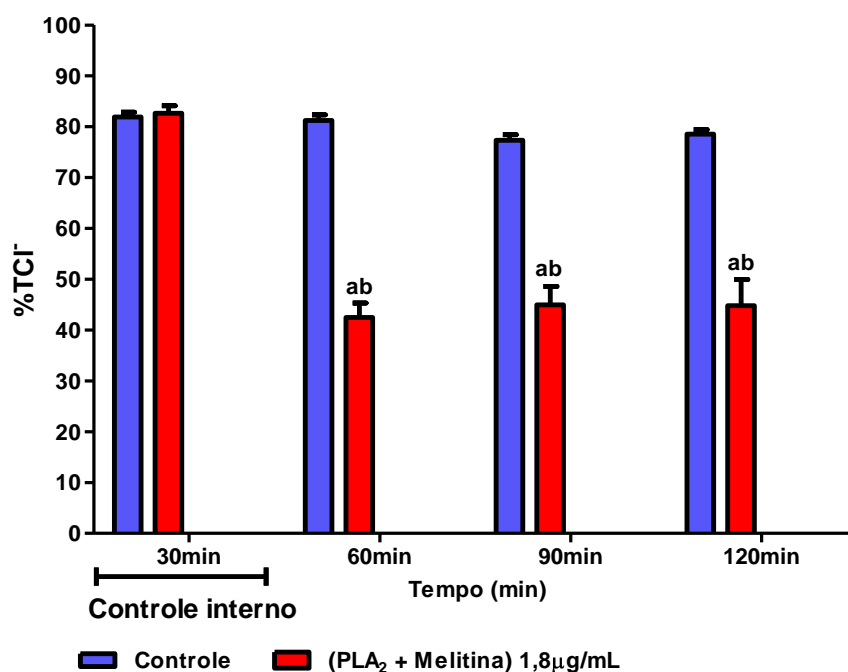


**Figura 38.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

**Tabela 13.** Valores de percentual de transporte de potássio (%TK<sup>+</sup>) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	69,13	4,14	75,64	3,01
60	69,04	5,68	54,56 <sup>ab</sup>	6,56 <sup>ab</sup>
90	71,84	4,21	48,00 <sup>ab</sup>	5,66 <sup>ab</sup>
120	69,94	6,86	42,32 <sup>ab</sup>	6,54 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).



**Figura 39.** Efeito da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) no percentual de transporte de cloreto (%TCI<sup>-</sup>). Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) na concentração de 1,8µg/mL – n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

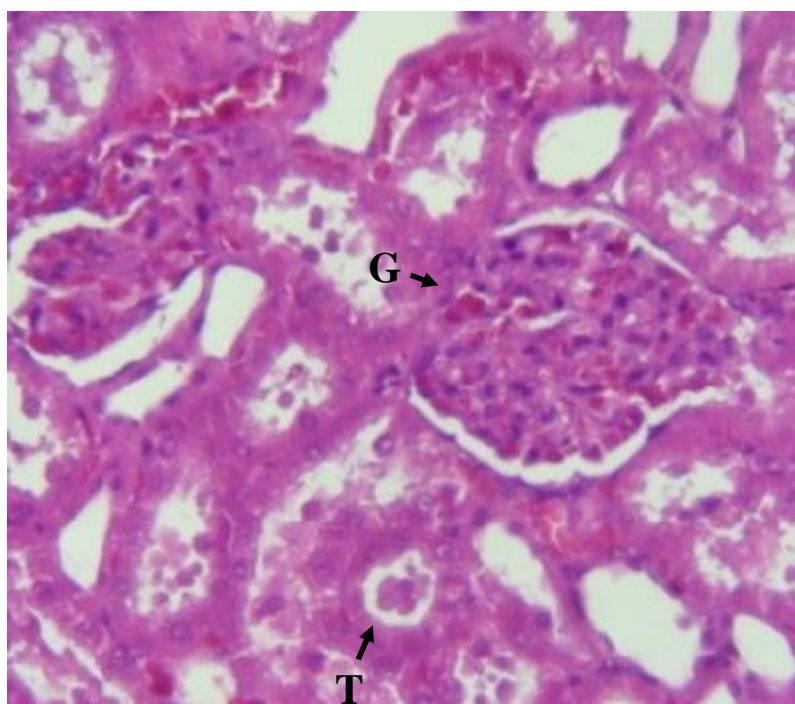
**Tabela 14.** Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl) nos experimentos realizados com a fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) do veneno da abelha *Apis mellifera*.

Tempo (min)	Grupos estudados			
	Grupo controle		Fração PLA <sub>2</sub> + Melitina 1,8µg/mL	
	Média	EPM	Média	EPM
30	79,90	0,98	78,91	1,76
60	81,25	1,06	53,66 <sup>ab</sup>	8,68 <sup>ab</sup>
90	77,32	1,12	50,28 <sup>ab</sup>	5,25 <sup>ab</sup>
120	78,53	0,89	44,15 <sup>ab</sup>	6,12 <sup>ab</sup>

Os resultados dos experimentos dos grupos Controle (n=6) e da fração (PLA<sub>2</sub> + Melitina) (1,8µg/mL - n=6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em 4 períodos (30, 60, 90 e 120min); “a” representa p<0,05 em relação ao grupo controle interno e “b” significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

#### 4.1.2 HISTOLOGIA DOS RINS PERFUNDIDOS COM VENENO TOTAL E FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + Melitina)

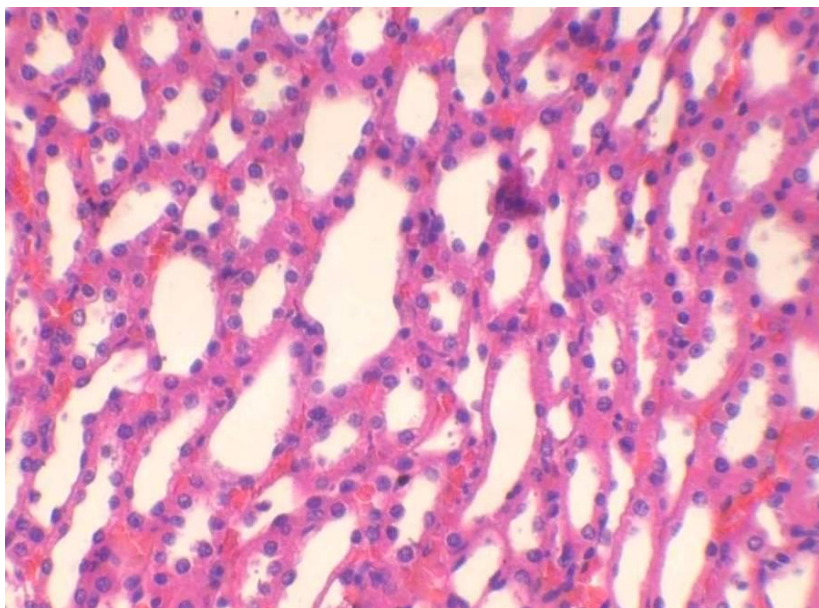
As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstício), assim como os rins do grupo controle perfundidos somente com solução de Krebs. (figuras 40, 41, 42 e 43).



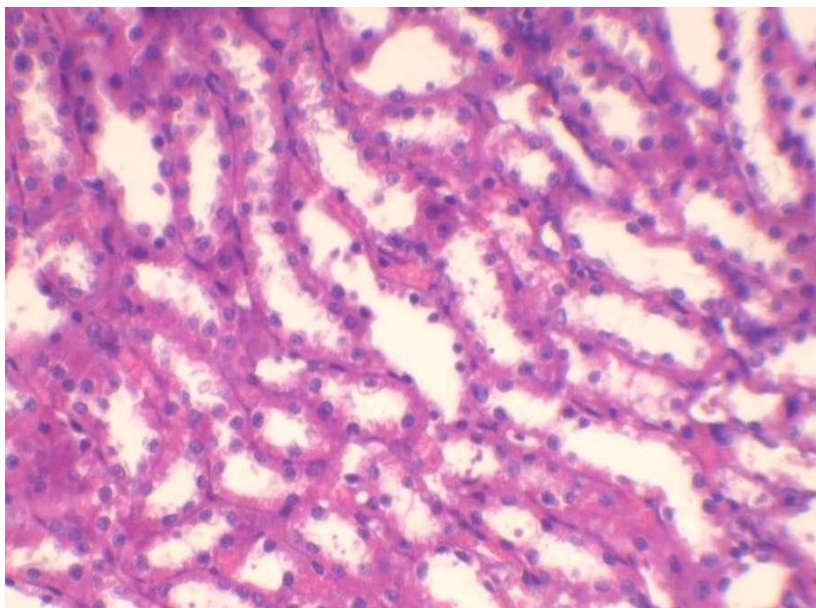
**Figura 40.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 41.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

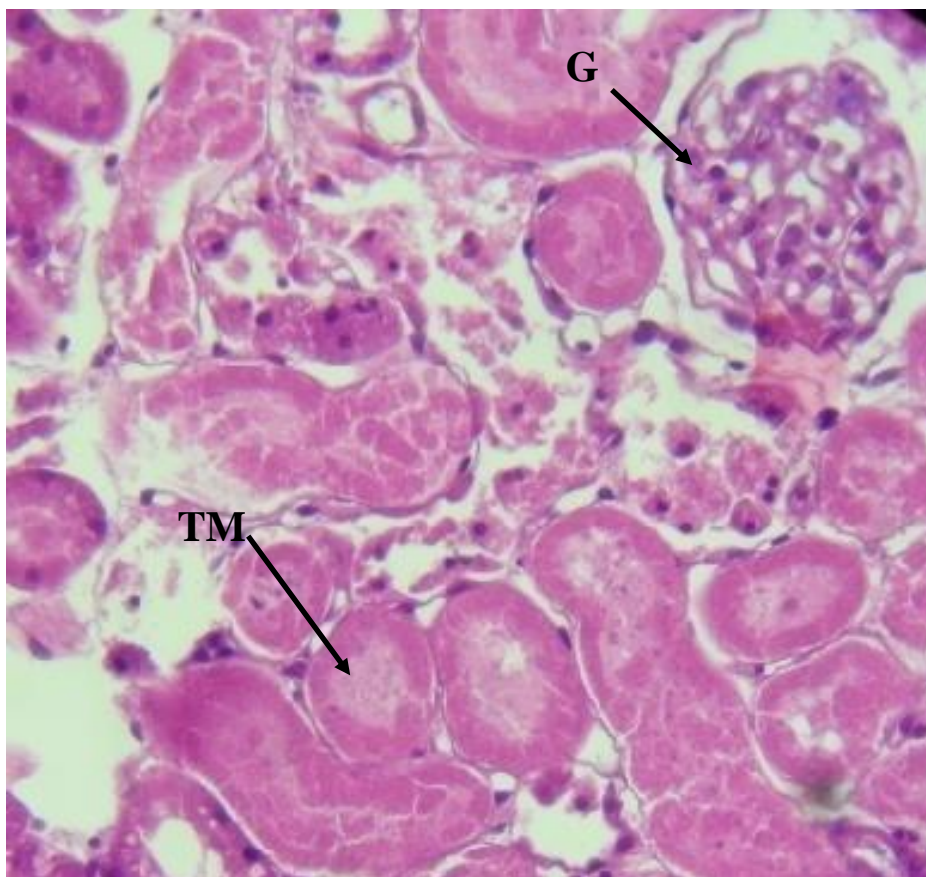


**Figura 42.** Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos contorcidos distais normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

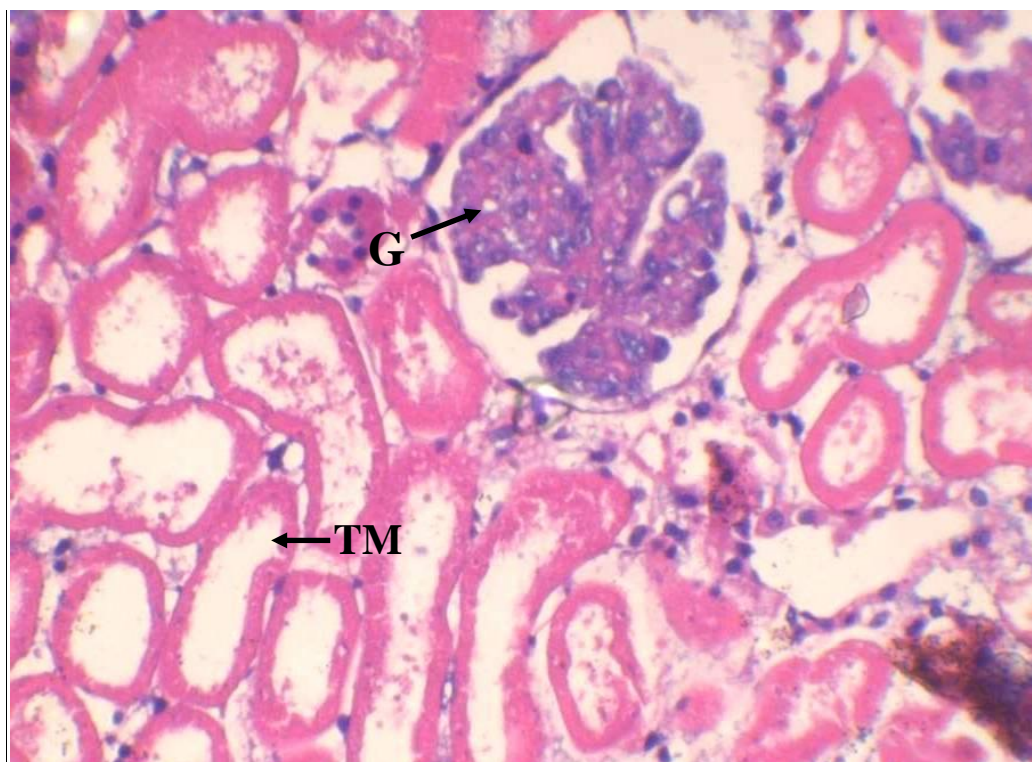


**Figura 43.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit demonstrando túbulos normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

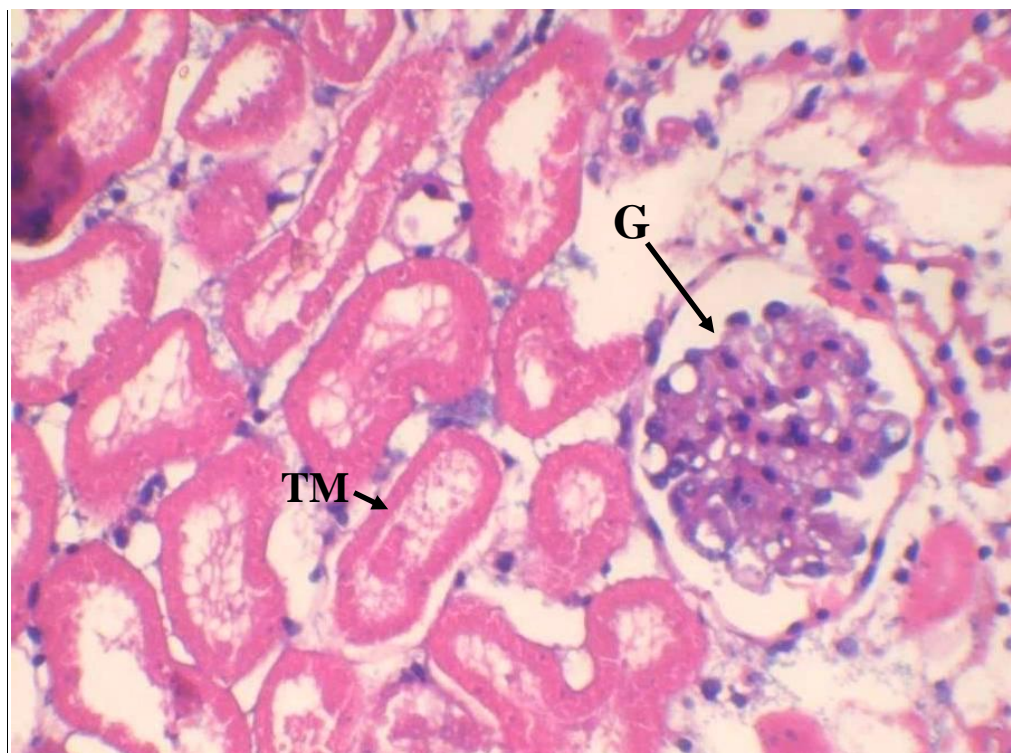
Nos túbulos renais apresentados nas figuras 44, 45, 46, e 47, observam-se depósitos intertubulares, verdadeiros cilindros e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose e apoptose/dano direto às células tubulares em todas as concentrações do veneno total de *Apis mellifera* estudadas. As outras estruturas como glomérulos, vasos e interstício permaneceram íntegras à microscopia de luz.



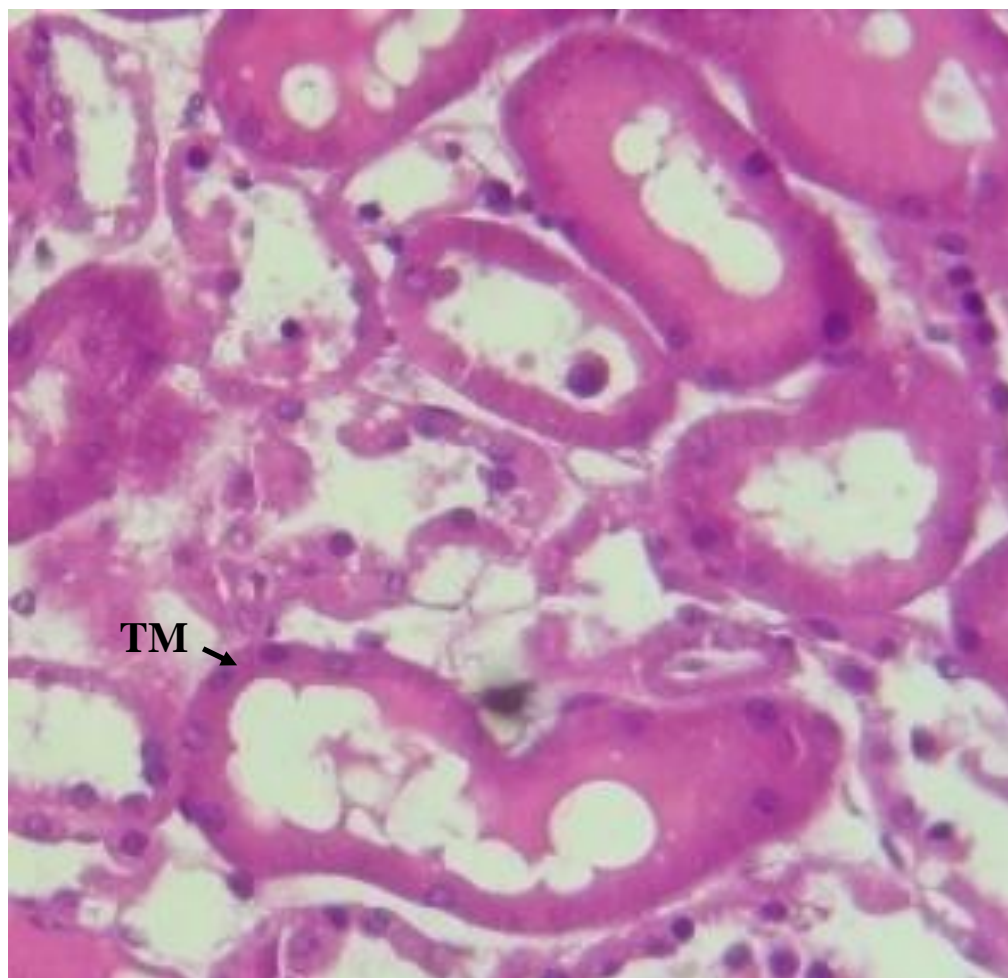
**Figura 44.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (1 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 45.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (3,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

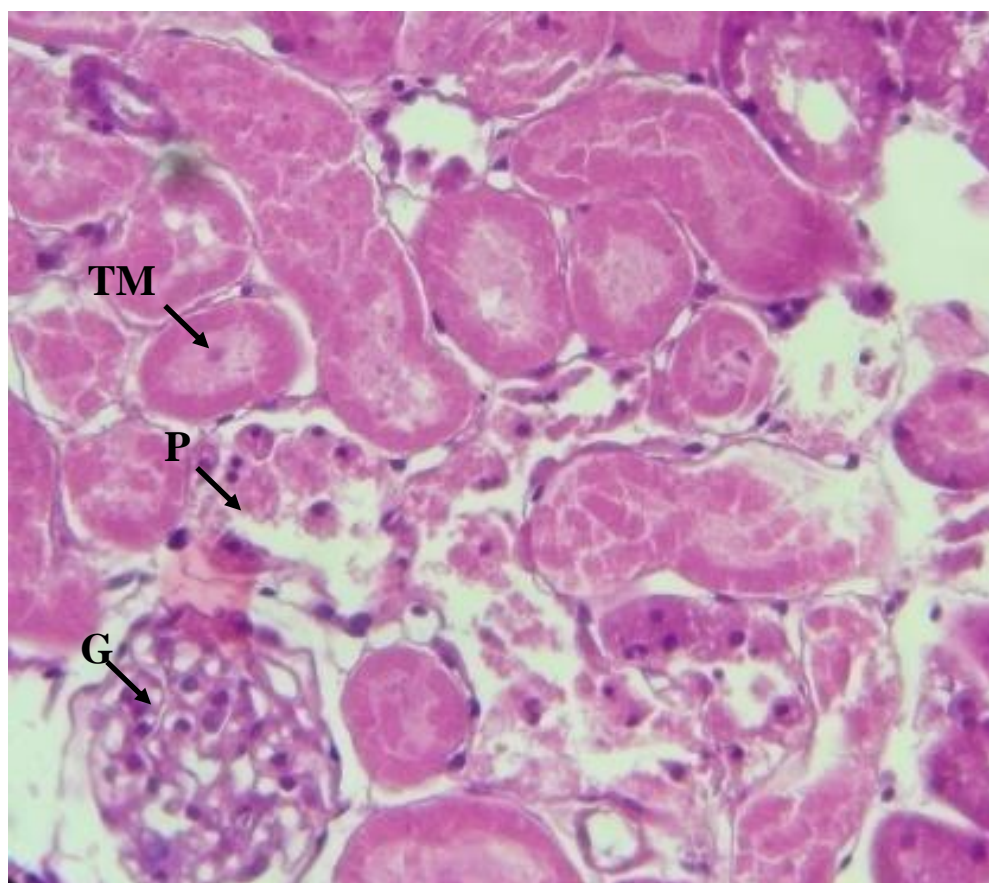


**Figura 46.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* (10,0 $\mu$ g/mL) demonstrando túbulos com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e glomérulo (G) normais (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

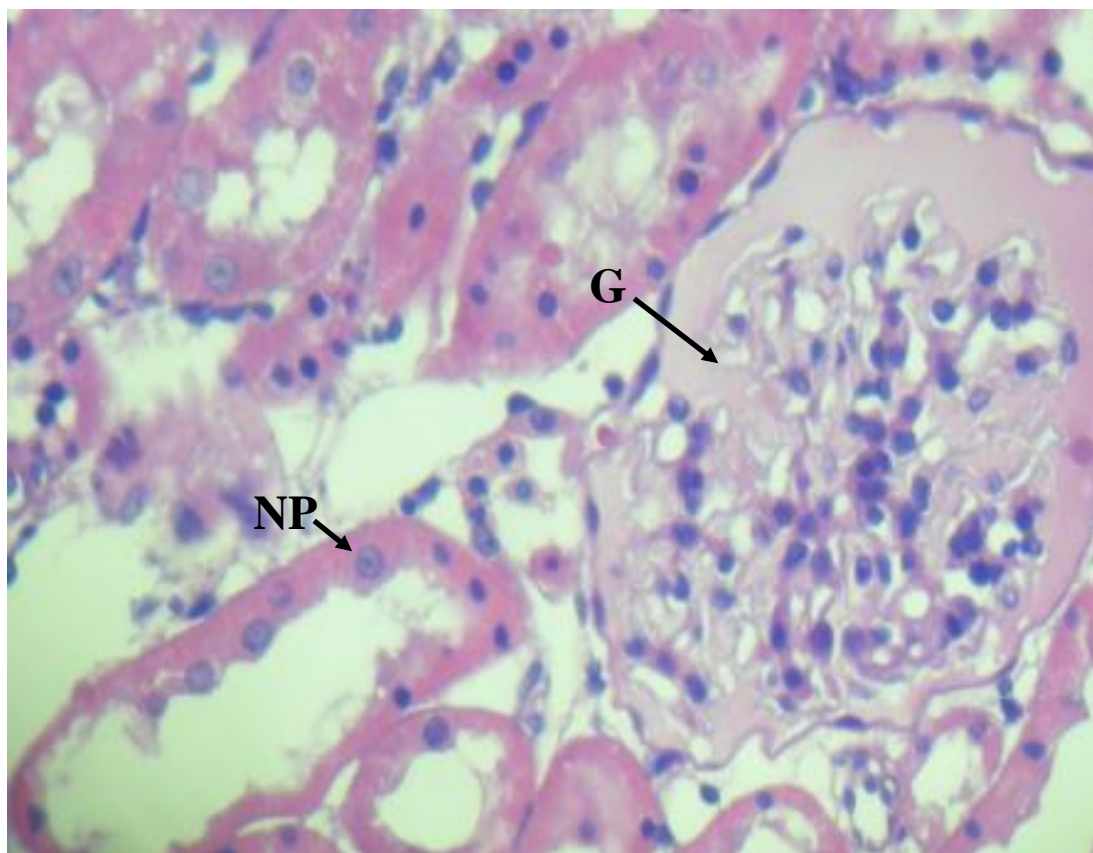


**Figura 47.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e veneno total de *Apis mellifera* ( $3\mu\text{g/mL}$ ) demonstrando túbulos dilatados, depósitos hialinos formando cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

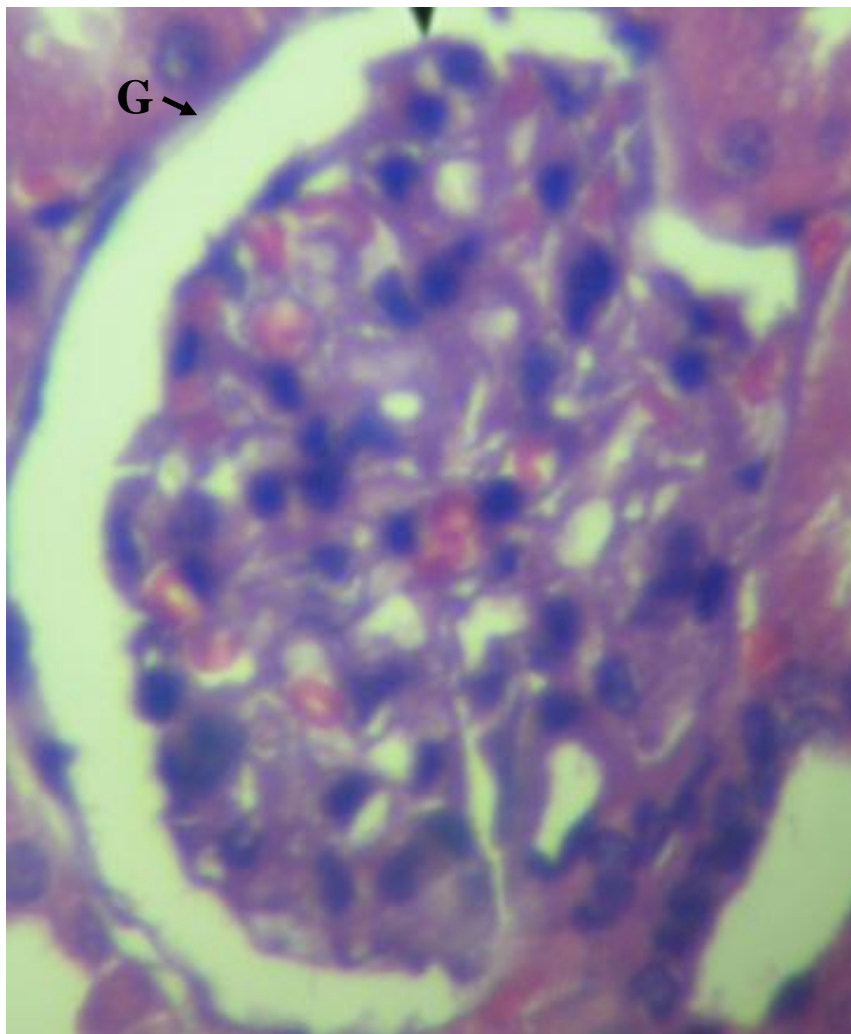
No túbulo renal apresentado na figura 48, observa-se depósito intertubular, verdadeiro cilindro e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose ou apoptose, no glomérulo apresentado nas figuras 49 e 50, observam-se discreta deposição de substâncias eosinofílica e material protéico, esse dano direto à célula tubular e glomerular na concentração de  $1,8\mu\text{g/mL}$  da fração complexada ( $\text{PLA}_2$  + melitina) de *Apis mellifera* estudada. As outras estruturas como vasos e interstício permaneceram íntegras à microscopia de luz.



**Figura 48.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações ( $\text{PLA}_2$  + melitina) do veneno de *Apis mellifera* ( $1,8\mu\text{g/mL}$ ) demonstrando túbulos dilatados com depósito intertubular, verdadeiros cilindros e com células sem núcleos e/ou núcleos picnóticos, indicativos de morte celular (TM) e plasmócito (P) (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



**Figura 49.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo com elevada deposição de material protéico e presença de núcleos picnótico (NP) indicativos de morte celular (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 1000X).

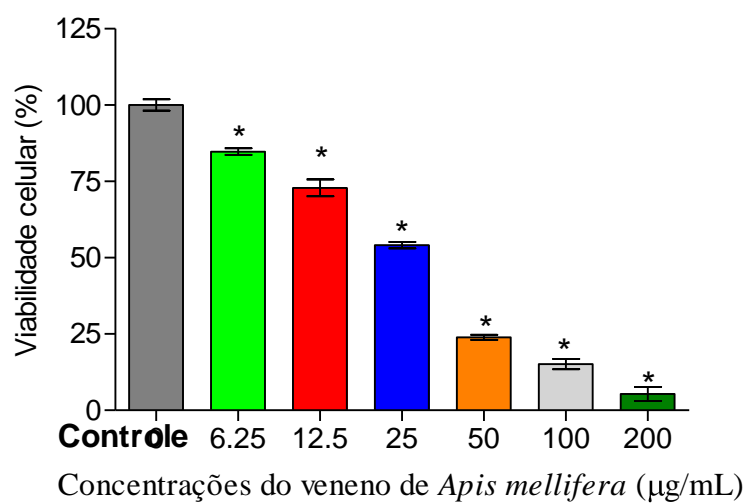


**Figura 50.** Fotomicrografia do rim direito perfundido com solução de Krebs-Henseleit e frações (PLA<sub>2</sub> + melitina) do veneno de *Apis mellifera* (1,8µg/mL) demonstrando glomérulo discreta deposição de substância eosinofílica (n=6 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 1000X).

## 4.2 ENSAIOS COM CULTURA DE CÉLULAS

### 4.2.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE

O efeito do veneno total de *Apis mellifera* nas células tubulares renais foi avaliado através de culturas de células MDCK. A viabilidade das culturas tratadas ( $1,0 \times 10^5$  /poço) com veneno (6,25; 12,5; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 $\mu\text{g/mL}$ ) foi analisada pelo método MTT após 24h de incubação. Os resultados demonstraram um efeito citotóxico dependente da concentração do veneno, com valor da  $CI_{50}$  47.84 $\mu\text{g/mL}$  (Figura 51 e tabela 15). As fotomicrografias das células MDCK também permitem demonstrar a morte celular induzida pelo veneno de *Apis mellifera*. Na figura 52 podem ser visualizadas células pertencentes ao grupo controle negativo, enquanto que na figura 53 verifica-se o padrão de morte celular induzido pelo veneno testado.



**Figura 51.** Percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de percentual de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

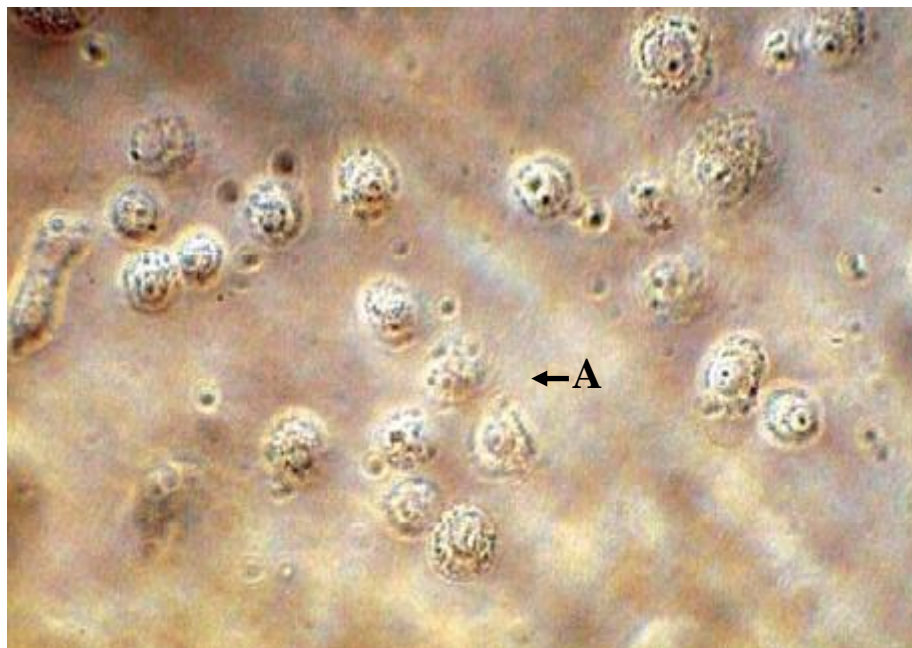
**Tabela 15.** Valores de percentual de viabilidade celular das células MDCK expostas ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).

Grupos experimentais													
Controle		VAM 6,25µg/mL		VAM 12,50µg/mL		VAM 25,00µg/mL		VAM 50,00µg/mL		VAM 100,0µg/mL		VAM 200,00µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,00	1,86	84,79*	1,06	79,06*	1,24	66,75*	1,31	52,93*	2,16	39,50*	3,28	5,38*	2,28

Os resultados dos experimentos (n=3 – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), em % de viabilidade celular. “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle negativo (ANOVA – Tukey).

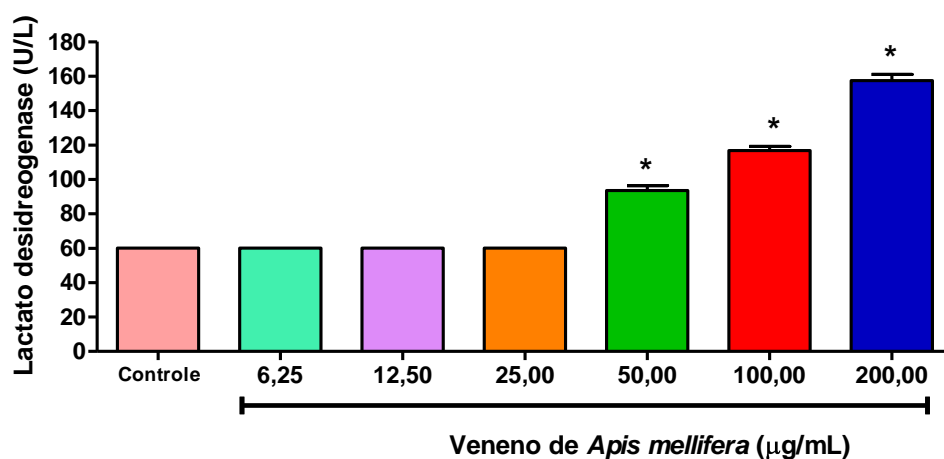


**Figura 52.** Fotomicrografia das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) do grupo controle (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).



**Figura 53.** Fotomicrografia representativa das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) expostas ao veneno total de *Apis mellifera*, (50,0  $\mu\text{g/mL}$ ), presença de agrupamento celular e citoplasma granuloso e demonstrando o padrão de morte celular observado, onde A representa as células expostas ao VAM (n=3 – amostras em triplicata - aumento de 400X).

Para investigar se o veneno foi capaz de alterar a integridade da membrana foram mensurados os níveis de lactato desidrogenase (LDH) e foi observado um aumento significativo nas maiores concentrações estudadas, corroborando assim com as alterações morfológicas observadas em culturas de células. Esses resultados podem ser visualizados na figura 54 e na tabela 16.



**Figura 54.** Níveis de lactato desidrogenase (LDH) encontrados em sobrenadante de cultivo celular de células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL), nos quais os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) em termos de U/L (unidades por litro). “\*” representa  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle ( $n=3$  – amostras em triplicata - ANOVA – Tukey).

**Tabela 16.** Valores de lactato desidrogenase (LDH – U/L) do sobrenadante do cultivo celular de células MDCK expostas ao veneno total da abelha *Apis mellifera* (VAM) nas concentrações de ( 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 e 200,00 µg/mL).

Grupos experimentais													
Controle		VAM 6,25µg/mL		VAM 12,50µg/mL		VAM 25,00µg/mL		VAM 50,00µg/mL		VAM 100,0µg/mL		VAM 200,00µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
32,78	2,66	47,49*	9,36	45,49	13,55	42,16	12,02	66,81*	11,65	72,78*	4,80	87,44*	3,53

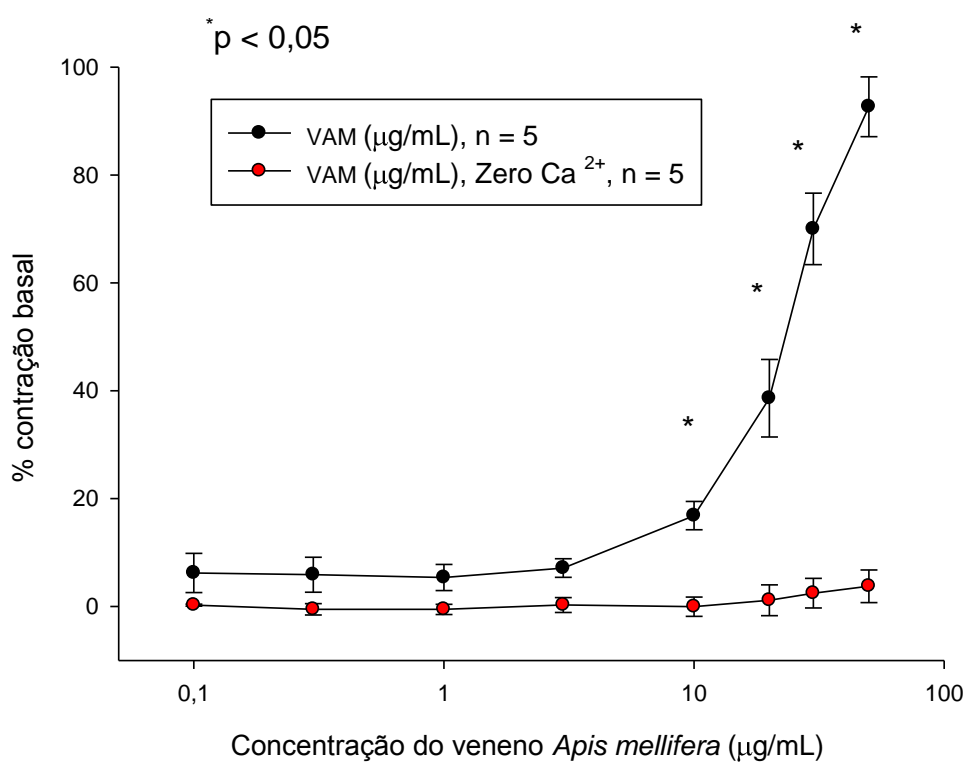
Os resultados dos experimentos (n=3 – amostras em triplicata) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM) e em U/L (ANOVA – Tukey).

### 4.3 ANEL DE AORTA COM ENDOTÉLIO

#### 4.3.1 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL DE AORTA ISOLADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE CÁLCIO

O veneno total da abelha *Apis mellifera* nas concentrações de (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 $\mu$ g/mL), adicionado cumulativamente, produziu, de maneira concentração dependente, um aumento do tônus basal da aorta isolada com magnitude correspondente a  $137 \pm 14,6\%$  (n=5) em relação à contração de referência induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>, como demonstrado na figura 55.

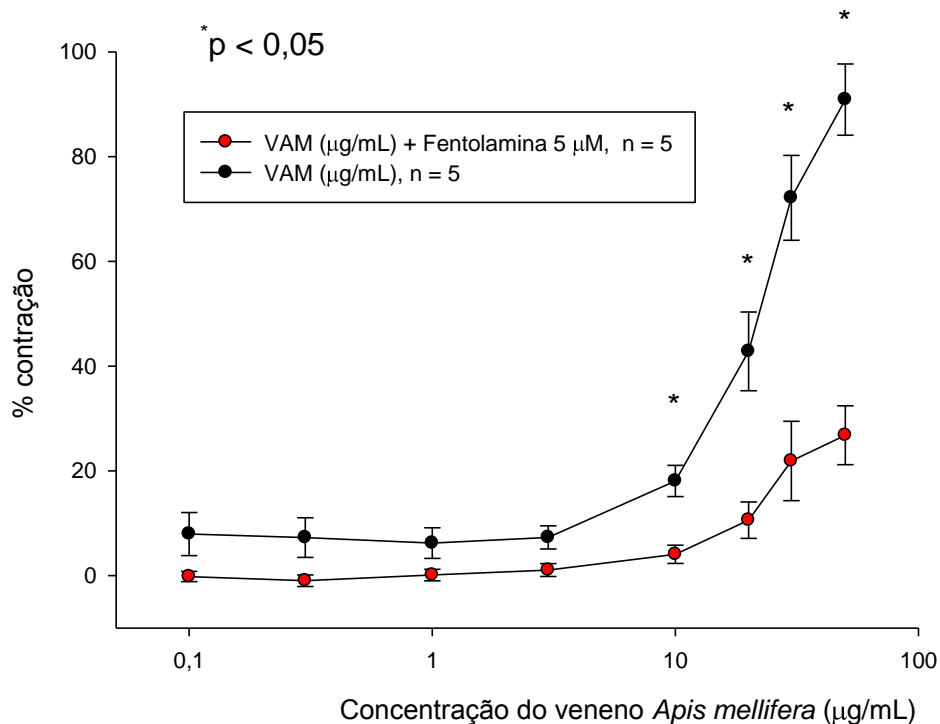
Para avaliar o envolvimento do cálcio extracelular no efeito do veneno a preparação foi mantida em meio sem cálcio e na presença de EGTA (1mM). O efeito vasoconstrictor do veneno total de *Apis mellifera* foi significativamente reduzido nas concentrações 3, 10 e 20 $\mu$ g/mL (Figura 55).



**Figura 55.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca<sup>2+</sup> 1mM ( ● , n=5; 0,1-50µg/mL) e na ausência de Ca<sup>2+</sup> 1mM ( ● , n=5; 0,1-50µg/mL). Valores expressos em média ± E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \* p < 0,05.

### 4.3.2 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE FENTOLAMINA

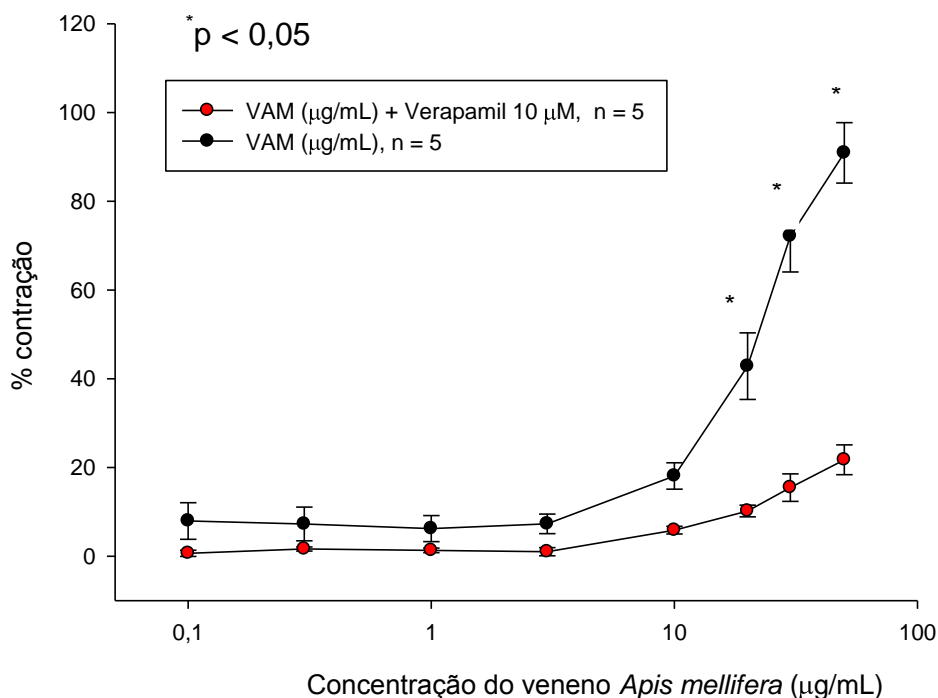
Para avaliar o envolvimento de receptores adrenérgicos no efeito contrátil do veneno foi adicionada fentolamina (5 $\mu$ M) que reduziu significativamente o efeito produzido pelo veneno (figura 56).



**Figura 56.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem fentolamina (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de fentolamina (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \* p < 0,05.

### 4.3.3 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE VERAPAMIL

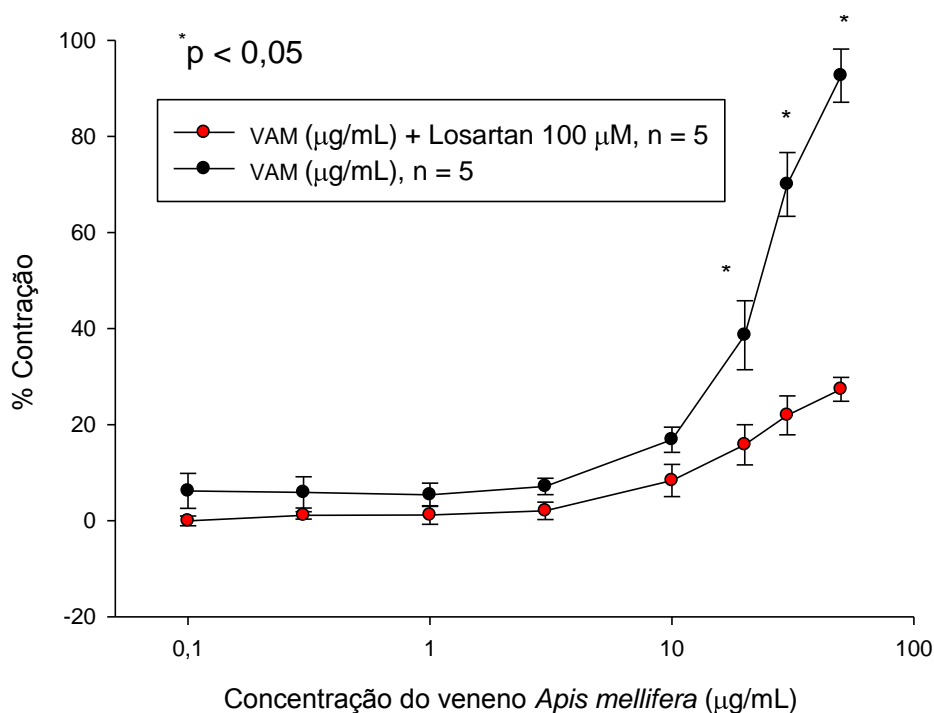
A adição prévia de verapamil (10  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador dos canais de cálcio, também reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 10, 20, 30 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , conforme demonstrado na figura 57.



**Figura 57.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem verapamil (●,  $n=5$ ; 0,1-50  $\mu\text{g/mL}$ ) e na presença de verapamil (●,  $n=5$ ; 0,1-50  $\mu\text{g/mL}$ ). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE LOSARTAN

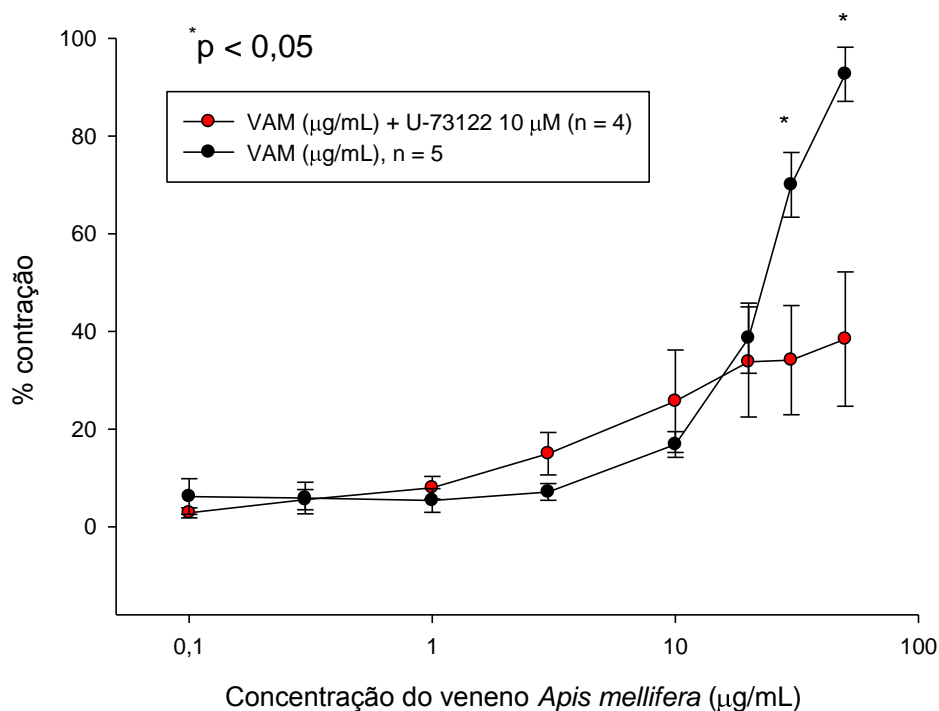
Na busca do entendimento da ação do veneno total de *Apis mellifera* sobre o tecido de aorta, foi adicionado losartan (100  $\mu$ M), um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II. Também reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 10, 20, 30 e 50  $\mu$ g/mL, conforme demonstrado na figura 58.



**Figura 58.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem losartana (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de losartan (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M., ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.5 EFEITO DO VENENO TOTAL DE *Apis mellifera* NA PRESENÇA DE INIBIDOR DA FOSFOLIPASE C (U – 73122)

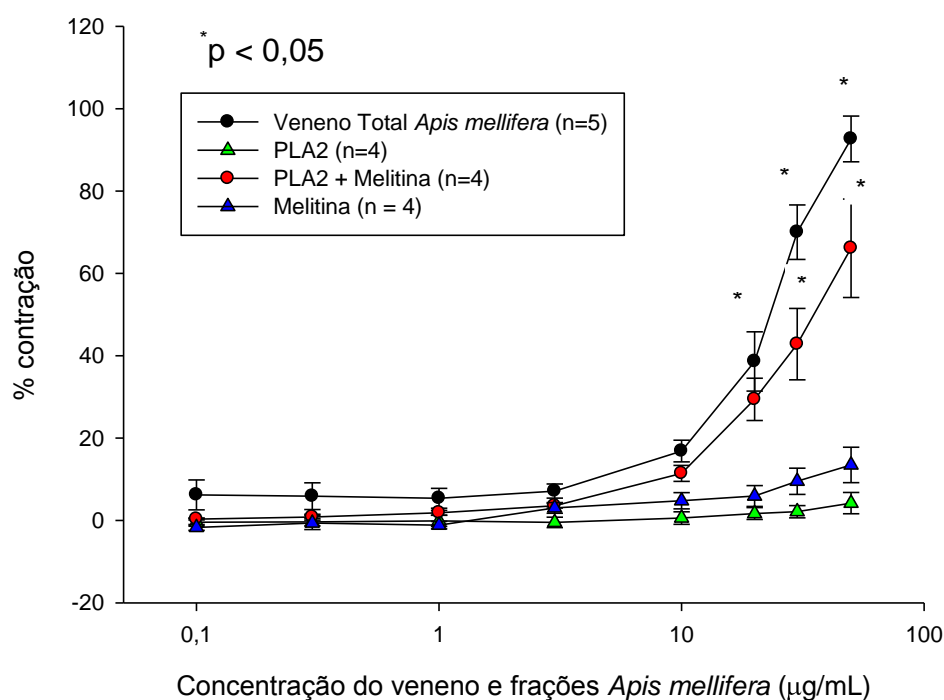
Um inibidor de fosfolipase C (U-73122, 10 $\mu$ M), após o período de equilíbrio do tecido com endotélio intacto, seguida da adição do veneno, reduziu significativamente a vasoconstrição induzida pelo veneno total de *Apis mellifera* nas concentrações 20, 30 e 50 $\mu$ g/mL (Figura 59).



**Figura 59.** Curva concentração-efeito do veneno total de *Apis mellifera* em aorta com o endotélio intacto sem inibidor de fosfolipase C (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL) e na presença de inibidor de fosfolipase C (●, n=5; 0,1-50 $\mu$ g/mL). Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. , ANOVA, Holme-Sidak \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.6 EFEITO DAS FRAÇÕES PLA<sub>2</sub> E MELITINA ISOLADAS, E EFEITO DA FRAÇÃO COMPLEXADA (PLA<sub>2</sub> + MELITINA) DO VENENO DE *Apis mellifera* NA TENSÃO BASAL

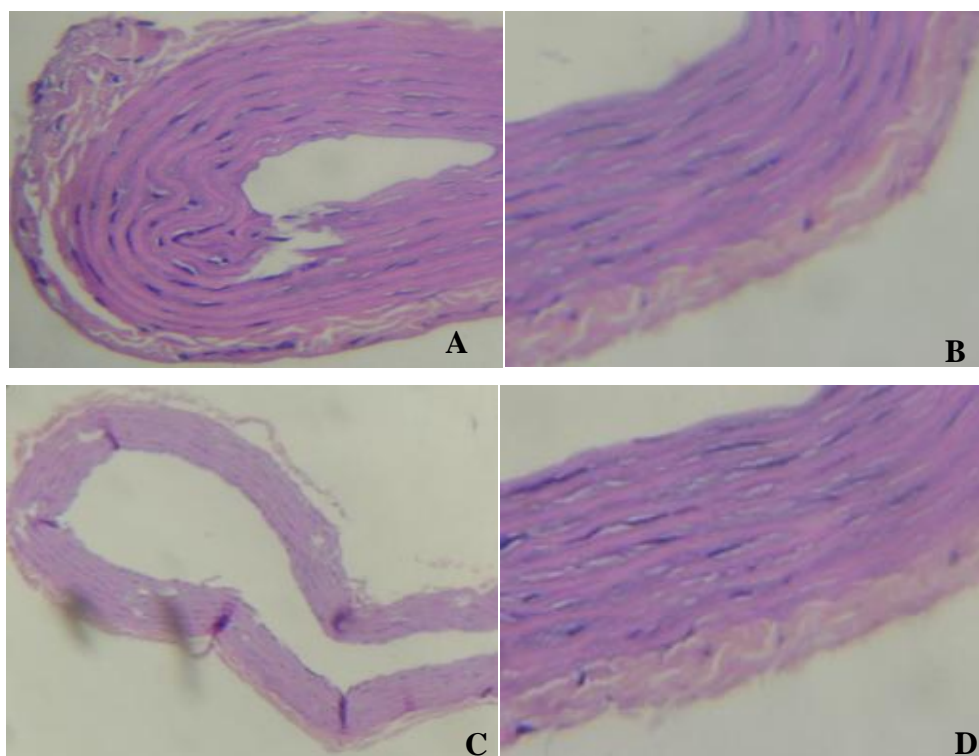
A fração complexada (PLA<sub>2</sub> + Melitina) da abelha *Apis mellifera* (0,1–50,0µg/mL), produziu um aumento do tônus basal da aorta isolada semelhante ao veneno total, demonstrando a relação do efeito à ligação dos peptídeos na forma complexada, no entanto, as frações isoladas não alteraram o tônus basal, como demonstrado na figura 60.



**Figura 60.** Curva concentração-efeito em aorta com o endotélio intacto na presença de Ca<sup>2+</sup> 1mM com veneno total de *Apis mellifera* (●, n=5; 0,1-50µg/mL), com a fração complexada PLA<sub>2</sub>+ melitina (●, n=5; 0,1-50µg/mL), com a fração isolada de PLA<sub>2</sub> (●, n=5; 0,1-50µg/mL) e com a fração isolada de melitina (●, n=5; 0,1-50µg/mL). Valores expressos em média ± E.P.M., ANOVA, Holme-Sidak  $p < 0,05$ .

#### 4.4 HISTOLOGIA DOS ANÉIS DE AORTA

Em nenhum dos protocolos observaram-se alterações histológicas no anel de aorta, seja nos grupos controle ou nos grupos expostos ao veneno de *Apis mellifera*; independentemente da concentração de VAM estudada (figura 61).



**Figura 61.** Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado. Onde “**A**” representa o grupo controle, “**B**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração  $PLA_2$  do veneno *Apis mellifera* (VAM), “**C**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração melitina do veneno *Apis mellifera* (VAM), “**D**” anel de aorta exposto à concentrações cumulativas da fração complexada  $PLA_2$  + melitina do veneno *Apis mellifera* (VAM), (n=4 - coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).

# DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

*O mais sábio é aquele que sabe que não sabe*

*Sócrates*

## 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No Brasil, em 1956, devido as abelhas africanizadas terem escapado de cativeiros, houve uma disseminação dessa espécie por todo o continente americano. Estes insetos são únicos em seu comportamento agressivo, caracterizando-se por ataques maciços com grande quantidade de veneno injetada em suas vítimas. Os acidentes com esses insetos apresentam certa severidade, com um número elevado de pacientes evoluindo com complicações graves ou óbito, incluindo injúrias renais (PENTEADO *et al.*, 2003).

Os acidentes por ferroadas de abelhas apresentam distintas manifestações clínicas, dependendo da sensibilidade do indivíduo ao veneno e do número de ferroadas (ALMEIDA *et al.*, 2011). Devido ao crescente número de acidentes com abelha *Apis mellifera* no Brasil e na América Latina, verifica-se a importância de estudos que tentam demonstrar evidências desse tipo de complicações, bem como seus possíveis mecanismos fisiopatológicos.

No presente estudo, ensaios com perfusão renal, foi verificado que o veneno total de *Apis mellifera* induziu aumento na pressão de perfusão em rim isolado de rato, apresentando alterações similares às encontradas por Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011) ao estudarem as espécies do tipo escorpião *Tityus serrulatus* e vespa *Polybia paulista*, respectivamente. É importante salientar que esses trabalhos descritos na literatura utilizam o mesmo modelo experimental, demonstrando efeitos similares com venenos de outra família e outros artrópodes.

Os resultados com infusão do veneno bruto de *Apis mellifera* em rim isolado, demonstraram aumento da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. O efeito do veneno sobre a resistência renal foi provavelmente o responsável por esse aumento na filtração glomerular, levando ao conseqüente aumento do fluxo urinário. Todos esses fatores decorrem em virtude do processo de filtração renal depender de diversos fatores que interagem a nível glomerular, tais como, alterações na pressão de perfusão, influenciada pela resistência vascular. Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011)

demonstraram que o veneno total do escorpião *Tityus serrulatus* e da vespa *Polybia paulista* foram capazes de induzir diversas alterações na função renal, como aumento na pressão de perfusão, na resistência vascular renal, no fluxo urinário e no ritmo de filtração glomerular, bem como redução no percentual de transporte total de sódio, potássio e cloreto.

Em relação à excreção de eletrólitos, pode-se observar que o veneno total de *Apis mellifera* age de forma regular, com potente natriurese e diurese pressórica. A observação de danos diretos nos túbulos renais pode ser, dependendo de sua intensidade, irreversível (VIKRANT *et al.*, 2005). No presente estudo, verificou-se uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, sugerindo que a toxina da abelha *Apis mellifera* exerça injúria sobre os túbulos renais.

Acidentes com *Hymenoptera* geralmente provocam o aumento da pressão de perfusão renal, que é ocasionada provavelmente pelo excesso de liberação de catecolaminas e outros compostos biologicamente ativos presentes no veneno (STRASSER *et al.*, 1992). Além disso, o acidente com abelhas pode induzir a liberação endógena dessas substâncias por componentes da peçonha, como as fosfolipases A<sub>2</sub> (GRISOTTO *et al.*, 2006).

Para manter o fluxo sanguíneo renal constante, a pressão arterial renal pode variar de 80 a 200mmHg. Quando a pressão renal aumenta, o fluxo sanguíneo renal e o ritmo de filtração glomerular tendem a aumentar, provavelmente por ativação de receptores adrenérgicos (EATON; POOLER, 2008).

As arteríolas aferentes e eferentes possuem inervação simpática que provoca vasoconstrição pela ativação de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, porém, as arteríolas aferentes apresentam uma maior densidade destes receptores (STRASSER *et al.*, 1992). Existe no rim uma densa inervação adrenérgica e uma intensa produção de catecolaminas, as quais, quando liberadas, regulam a hemodinâmica renal predominantemente com vasoconstrição, mediada por receptores  $\alpha$ 1 e via proteína G (Gq). Quando esse receptor é ativado, aumenta a resistência vascular, afeta a

redistribuição do fluxo sanguíneo cortical para regiões mais medulares e eleva a síntese de renina (AWE e ADEAGBO, 2007).

SCHWINN *et al.*, (2004), ao analisar o rim, além de encontrarem aumento da expressão de RNAm para o receptor subtipo  $\alpha 1b$ , observaram que antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos auxiliam no relaxamento e vasodilatação do músculo liso, podendo levar a alterações na função erétil através da via receptor  $\alpha 1d$ . No entanto, outros autores também sugerem a participação de receptores  $\alpha 1a$  e  $\alpha 1d$ . Dessa forma, os três subtipos de receptores contribuem para a resposta constrictora em rins perfundidos (AWE e ADEAGBO, 2007).

A pressão arterial renal, fisiologicamente, pode variar no intuito de manter o fluxo sanguíneo renal constante. A pressão de perfusão renal está relacionada diretamente com o fluxo e o ritmo de filtração glomerular, provavelmente, pela ativação de receptores adrenérgicos presentes nas arteríolas renais e em outros leitos vasculares. Assim, sugere-se que o efeito vasoconstritor da arteríola eferente reduz a saída de sangue do glomérulo, levando ao aumento na resistência dos capilares glomerulares e conseqüentemente do filtrado glomerular (JOHNSON, 2000). Dessa forma, as alterações renais encontradas no presente estudo sugerem a participação de receptores adrenérgicos.

Com o estudo das duas principais frações constituintes do veneno, foi possível verificar que as alterações renais se devem à soma das duas frações complexadas ( $PLA_2$  + Melitina), pois o complexo de fração seria o principal responsável pelos efeitos vasculares de pressão de perfusão, resistência vascular, aumento do fluxo urinário e diminuição do transporte de eletrólitos. Relata-se que as toxinas presentes no veneno liberam quantidades maciças de catecolaminas responsáveis pelos efeitos supra-citados. Esses resultados também podem ser objetos de interação das toxinas isoladas com o sistema adrenérgico, entretanto, o bloqueio dos efeitos com o antagonista  $\alpha$ -adrenérgico não foi realizado em perfusão renal.

A insuficiência renal aguda (IRA) pode ser caracterizada por uma deterioração na função renal, deterioração que acontece no intervalo de horas a dias, resultando na falência dos rins em excretar produtos nitrogenados e em manter o equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-básico (YU *et al.*, 2007).

Das e Mukherjee (2008) sugeriram em estudos experimentais e clínicos que a patogênese das lesões renais induzidas por venenos de abelha está relacionada com a ocorrência de vasoconstrição, toxicidade direta e rabdomiólise nas células tubulares renais.

A rabdomiólise está relacionada como uma das causas da falência renal aguda. É uma síndrome que pode ser ocasionada por inúmeras fatores, e, dentre eles, pode-se citar: trauma muscular, imobilização prolongada, estado de mal convulsivo, hipertermia maligna, exercício físico extenuante, exposição à drogas e ataques de abelhas africanizadas (FIGHERA *et al.*, 2007). Sendo assim, a rabdomiólise pode ser caracterizada por lesão muscular extensa com liberação de inúmeras substâncias intracelulares na circulação, tais como: creatinina fosfoquinase (CPK), lactato desidrogenase (LDH), mioglobina e aspartato transaminase AST. . No entanto, nos modelos realizados no presente estudo não foi possível visualizar rabdomiólise (VANHOLDER *et al.*, 2000).

Daher *et al* (2009), ao fazer uma revisão de evenenamentos por ferroadas de abelhas, observou hemólise e rabdomiólise em 50% dos casos avaliados. Segundo dados da literatura, a quantidade de ferroadas é importante para a evolução do quadro clínico. Acidentes com mais de 500 ferroadas evoluem com rabdomiólise e IRA, e, nesses casos, faz-se necessário o tratamento dialítico. No entanto, mesmo na vigência de tratamento dialítico, a mortalidade média nesses casos gira em torno de 20% (THIRUVENTHIRAN *et al.*, 1999)

É importante salientar que a IRA causada por rabdomiólise induzida por ferroadas de abelhas africanizadas é grave e está associada a uma elevada mortalidade, devendo ser tratada precocemente (DAHER *et al.*, 2009).

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao envolvimento do rim não estão bem esclarecidos. A insuficiência renal aguda que ocorre após ataques maciços de abelhas pode estar associada a mecanismos tóxicos-isquêmicos com choque hipovolêmico e anafilático, os quais estão relacionados à lesão tubular por pigmentos. A presença desses pigmentos ocorre devido à lesão muscular (mioglobinúria), hemólise (hemoglobinúria) e efeito tóxico direto do veneno (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A falência renal aguda, associada à necrose tubular aguda, também é uma complicação frequente. Esse quadro parece ser devido aos efeitos interativos dos componentes do veneno, principalmente melitina e fosfolipase A<sub>2</sub>, que atuam nas membranas biológicas. A mioglobinúria presente em casos de falência renal se dá devido a mecanismos isquêmicos (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Na avaliação histopatológica de rins perfundidos, revelam-se depósitos intertubulares, verdadeiros cilindros e indícios de morte das células tubulares (picnólise e células anucleadas) sugestivos de necrose e/ou apoptose às células tubulares em todas as concentrações do veneno total de *Apis mellifera* estudadas. As outras estruturas como glomérulos, vasos e interstícios permaneceram íntegras à microscopia de luz.

A observação histopatológica de rins perfundidos com a fração complexada (PLA<sub>2</sub> + melitina) de *Apis mellifera*, também verificou alterações nos túbulos renais similares a apresentada quando exposta ao veneno total. No entanto, na região glomerular exposta à fração (PLA<sub>2</sub> + melitina), observou-se discreta deposição de substâncias eosinofílica e material protéico. As outras estruturas como vasos e interstícios permaneceram íntegras à microscopia de luz. Assim, a toxicidade direta do veneno e os efeitos vasculares encontrados, como o aumento pressórico renal, podem ter sido responsáveis pela passagem de proteínas dos capilares para o filtrado glomerular e pelo dano verificado a nível renal.

Conforme foi destacado, as análises histológicas realizadas com rins perfundidos demonstram que as células dos túbulos renais, de um modo geral, se

apresentam com núcleos picnóticos ou anucleados. Esses achados histológicos são sugestivos de apoptose e/ou necrose.

O veneno da abelha *Apis mellifera*, de um modo geral, demonstrou ser capaz de promover aumento na pressão de perfusão e resistência vascular renal, levando, conseqüentemente, à elevação do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário. Essas alterações foram acompanhadas de perda da função de transporte tubular de eletrólitos (sódio, potássio e cloreto), demonstrando, assim, uma injúria a nível tubular comprovada pela histologia.

Esses resultados histológicos corroboram com os achados de Alves *et al.* (2005) e Vinhote *et al.* (2011), já que em perfusão de rim isolado com o veneno de escorpião e vespas, respectivamente, foram observados picos pressóricos e depósito protéico nas estruturas renais similares ao encontrado neste trabalho. Grisotto *et al.*, (2006) ao realizar estudo com o veneno de abelhas, também observou extravasamento de proteínas para os túbulos renais.

Então, os dados descritos anteriormente indicam que o veneno da abelha *Apis mellifera* é capaz de induzir lesões diretas e/ou indiretas aos túbulos renais, podendo haver íntima relação dessas lesões com o desencadeamento de uma possível insuficiência renal aguda após acidentes com abelha africanizada.

Em função das alterações histológicas e dos parâmetros funcionais encontrados nos rins perfundidos com veneno da abelha *Apis mellifera*, foi avaliada a citotoxicidade induzida pelo veneno em cultura de células renais, mais especificamente com células do epitélio tubular (MDCK).

Os ensaios realizados com células MDCK reforçam a ação deletéria do veneno em células tubulares. Com esses experimentos, observou-se que o veneno na concentração de 50µg/mL é capaz de destruir quase 80% das células presentes na placa, pois, o veneno causou dano às células renais reduzindo a viabilidade celular. As determinações da atividade da enzima LDH sugerem que a morte celular é consequência da necrose e não da apoptose, pois, foi verificado que a perda da

integridade é acompanhada pelo aumento do lactato desidrogenase (LDH), confirmando o achado histológico realizado em rins perfundidos com veneno.

Corroborando com essa idéia, Vinhote *et al.* (2011) avaliaram a citotoxicidade induzida pelo veneno de vespa *Polybia paulista* em cultura de células renais, mais especificamente com células do epitélio tubular (MDCK), verificando a perda da viabilidade celular e do aumento da LDH. Nesse sentido, Han *et al.* (2002), ao observarem a citotoxicidade induzida pelo veneno de abelhas (Hymenoptera, Apidae) em cultura de células de túbulo proximal de coelhos, demonstraram a perda da viabilidade celular e o aumento da lactato desidrogenase. Grisoto *et al.* (2006) também demonstraram que após a adição do veneno de abelhas em túbulos proximais isolados de ratos foi observado um aumento significativo na liberação da lactato desidrogenase.

Han *et al.* (2002), além de verificarem que o veneno total de abelha e sua fração melitina aumentaram a absorção de cálcio nos túbulos proximais em culturas de coelho, descobriram que o veneno total de abelha e a fração melitina aumentam a formação de peróxido de lípido quando cultivadas com antioxidantes, pois o peróxido de lípido está relacionado com a perda da viabilidade celular. A fração PLA<sub>2</sub> do veneno está envolvida também com a toxicidade direta do túbulo proximal renal, pois, foi observado uma lesão mediante a hipóxia. Esses resultados sugerem que exista uma correlação estreita entre as frações melitina, PLA<sub>2</sub> e a ativação do canal de Ca<sup>2+</sup>, pois a correlação dos mesmos induziram lesão celular renal (HAN *et al.*, 2002)

Logo, as mortes celulares por necrose observadas nestes resultados, provavelmente, se dão pela presença das duas principais frações (PLA<sub>2</sub> e melitina) presentes na composição do veneno de abelha. Contribui para esses achados, a presença de extravasamento de proteínas, observada na histologia resultante de uma desestabilização da membrana basal glomerular.

Devido ter sido observado alterações vasculares renais com o veneno de *Apis mellifera*, foram feitos estudos com anel de aorta que comprovaram a participação

vascular no mecanismo de aumento da pressão de perfusão e da resistência vascular renal.

Os experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta mantidos sob tensão basal. Dessa forma, o efeito vasoconstritor do veneno total e das frações complexadas (PLA<sub>2</sub> + melitina) foi confirmado. As frações fosfolipase A<sub>2</sub> e melitina isoladas não apresentaram efeito contrátil em anéis de aorta. No entanto não foram observadas alterações nas análises histológicas realizada no presente trabalho.

A alteração na concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup>, frente a estímulos, constitui o mecanismo básico de regulação do estado contrátil do músculo liso. A concentração citoplasmática de cálcio necessária para o processo contrátil é finamente ajustada por canais iônicos, bombas, compartimentos e tampões intracelulares. Dessa forma, um aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> resulta em contração do músculo liso (FADZEAN; GIBSON, 2002).

Na maioria dos casos, a contração do músculo liso envolve uma combinação de entrada e liberação de cálcio. Os vários tipos de músculo liso podem diferir marcadamente a esse respeito: (1) na contribuição relativa das duas fontes de cálcio para a contração e (2) nos canais iônicos através dos quais o cálcio extracelular pode ter acesso ao interior da célula (FADZEAN; GIBSON, 2002).

Na contração do tecido muscular liso vascular, vários mecanismos estão envolvidos, já que células musculares lisas podem se contrair tanto de uma forma direta, como indireta. De uma forma direta, as células se contraem através de seus receptores específicos para neurotransmissores; e de uma forma indireta, a contração acontece através da liberação de substâncias derivadas do endotélio (COELHO *et al.*, 2002). Esse mecanismo de contração decorre do influxo de cálcio na membrana e da liberação dos estoques intracelulares presentes dentro do retículo sarcoplasmático, que têm papel fundamental na contração vascular (JACKSON, 2000).

Segundo Constanzo (2004), a contração do músculo liso ocorre principalmente pelo influxo de íon de cálcio para a célula muscular e, quando a concentração desse íon no líquido extracelular é reduzida, a contração do músculo liso é praticamente abolida.

Após a ativação de receptores específicos, substâncias neurotransmissoras excitatórias promovem influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais na membrana, aumentando seus níveis intracelulares iônicos para induzir eventos celulares e desenvolver a força no músculo liso vascular (JACKSON, 2000).

No presente estudo, observou-se que em meio sem a presença de cálcio, a resposta contrátil do veneno da abelha *Apis mellifera* (VAM) foi inibida. Da mesma forma, com o uso do verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio operado por voltagem, o efeito inibitório permaneceu. Sendo assim, o mecanismo subjacente proposto para o efeito contrátil do VAM envolve a abertura de canais de cálcio operados por voltagem.

As proteínas Gs intermediam a transmissão do sinal entre os receptores acoplados e seus efetores múltiplos, tais como enzimas e canais iônicos. Dentre os receptores presentes no mecanismo de contração do tecido vascular, os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos são alvos das proteínas G, principalmente com ação na enzima fosfolipase C, enzima essa que participa da formação de segundos mensageiros, tais como, trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (BOLTON *et al.*, 1999).

Os mecanismos farmacomecânicos para a contração após interação da célula muscular lisa com um agonista excitatório incluem: (1) Agonistas ligam-se a receptores acoplados à proteína G heterotrimérica, estimulando a atividade de fosfolipase C (PLC). Essa enzima é específica para o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), catalisando a formação de dois potentes segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e o diacilglicerol (DAG); (2) migração do  $\text{IP}_3$  a partir da membrana e interação com um receptor específico situado do retículo sarcoplasmático, permitindo a liberação de cálcio a partir desse estoque intracelular; (3) O DAG, junto com o cálcio, ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas-alvo específicas (AKATA, 2007).

A concentração intracelular elevada de cálcio se liga à proteína calmodulina (CaM), formando o chamado complexo cálcio-calmodulina ( $4Ca^{2+} \pm CaM$ ) ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK, do inglês myosin light chain kinase). A MLCK, por sua vez fosforila a cadeia leve de 20 kDa da miosina (MLC, do inglês myosin light chain) permitindo a interação entre actina e miosina (WEBB, 2003). Isso significa que o cálcio não ativa diretamente as proteínas contráteis do músculo liso. Ao invés disso, a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) de 20-kDa serve como mecanismo ativador da atividade de ATPase que promove interação actina-miosina, aumentando assim o número de ciclos de pontes cruzadas e permitindo a contração muscular (BARANY, 1996; SOMLYO *et al*, 1999) (Figura 61 – Anexo 3).

Na tentativa de elucidar a via envolvida pela contração da aorta, foi utilizado um bloqueador dos receptores alfa adrenérgicos (fentolamina) e um inibidor da fosfolipase C (U-73122). Pôde-se observar uma redução significativa no efeito contrátil do veneno total em anel de aorta, sugerindo a participação desses receptores na contração do tecido via enzima fosfolipase C.

Vinhote *et al.*, (2011) observaram alterações vasculares em anéis de aorta induzida pelo veneno de vespa *Polybia paulista*, verificando também que a contração da aorta depende da participação dos canais de cálcio operados por voltagem e que a contração da aorta está envolvida com a participação dos receptores alfa adrenérgicos.

Alvaro *et al.*, (2007), estudando os efeitos das toxinas presente no extrato da *Millepora complanata*, uma espécie de cnidário marino residentes em corais, também constatou efeito vasoconstrictor em anéis de aorta de ratos.

Esse achado corrobora com os resultados na aorta isolada encontrados em rim isolado de rato, verificando-se um aumento da pressão de perfusão renal devido a uma possível vasoconstricção dos vasos que irrigam o rim.

Logo, os dados desse estudo confirmam os resultados de vários trabalhos com veneno de abelha e dos seus principais componentes que apresentam efeito marcado sobre o sistema vascular.

Vale destacar que no presente estudo foi realizado apenas um screen “*in vivo*” do modelo de pressão arterial média (Anexo 4), pois os nossos traçados de pressão arterial não apresentaram resultados satisfatórios, já que além de ter sido feitos ensaios com um  $n < 6$  e somente um ter mostrado um bom resultado, não tínhamos mais veneno para prosseguir os experimentos. Entretanto, há uma grande quantidade de relatos na literatura que avaliam a pressão sanguínea arterial, conforme podemos verificar nos parágrafos seguintes.

Sendo assim, diante de todo o exposto, os resultados experimentais encontrados demonstraram que os principais componentes do veneno de abelha têm efeito sobre o sistema vascular e renal.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*O que não for bom para a colmeia também não é bom para a abelha.*

*Barão de Montesquieu*

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nos resultados com a infusão do veneno de *Apis mellifera* em rim isolado, foram observados aumentos da pressão de perfusão, da resistência vascular renal, do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário.
- O aumento da pressão de perfusão renal demonstrou ter um caráter vascular, uma vez que a elevação desse parâmetro é acompanhada do aumento da resistência vascular renal.
- Em relação à excreção de eletrólitos, pode-se observar uma redução significativa no percentual de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, sugerindo que a toxina da abelha *Apis mellifera* exerça injúria sobre os túbulos renais, comprovado pela histologia dos túbulos renais.
- As principais estruturas renais afetadas pelo veneno total e frações de *Apis mellifera* foram os túbulos renais e os glomérulos, provavelmente por ação direta do veneno nessas estruturas.
- Além da possibilidade de dano direto às estruturas renais, o aumento da pressão de perfusão renal contribui para uma ampliação dos danos aos tecidos renais, uma vez que estudos *in vitro* podem apresentar injúria tecidual.
- Os experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta quando expostos ao veneno total e as frações complexadas (PLA<sub>2</sub> + melitina). As frações fosfolipase A<sub>2</sub> e melitina isoladas não apresentaram efeito contrátil em anéis de aorta.
- Pôde-se observar que a contração da aorta acontece com a participação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C.

- Os dados desse estudo estão de acordo com os resultados de vários trabalhos com veneno de abelha e dos seus principais componentes que apresentam efeito marcante sobre o sistema vascular.

# CONCLUSÃO

*Ajuda-me, para que eu possa ajudar-te, para que juntos possamos subir a  
montanha.*

*Provérbio Grego*

## 7 CONCLUSÃO

Os parâmetros renais estudados demonstraram alterações vasculares renais quando expostos ao veneno total e às principais frações de *Apis mellifera*. O veneno bruto e frações dessa espécie agem de forma regular, com potente natriurese e diurese pressórica, levando a uma redução significativa no percentual de transporte tubular de eletrólitos, sugerindo que a toxina da abelha exerça injúria sobre os túbulos renais.

O veneno de *Apis mellifera* demonstrou ser nefrotóxico, apresentando possíveis efeitos deletérios diretos e/ou indiretos nos túbulos renais, como demonstrados pelos parâmetros histológicos do tecido renal e reforçados pelos ensaios com células MDCK. Sua atividade vasoconstrictora, associada com seu efeito direto sobre os túbulos renais podem ser características do envenenamento causado pela abelha *Apis mellifera*. Essas manifestações, quando associadas, podem ser responsáveis por uma possível insuficiência renal aguda.

Nossos experimentos revelaram um aumento na contratilidade dos anéis de aorta. O mecanismo subjacente proposto para o efeito contrátil do veneno de abelha envolve a abertura de canais operados por voltagem e a participação dos receptores alfa adrenérgicos via ativação da enzima fosfolipase C.

Finalizando, os estudos do veneno e suas frações em diferentes sistemas propiciam um maior conhecimento da fisiopatologia e uma elucidação dos mecanismos observados. Desta forma, pode levar à descoberta e bioprospecção de ferramentas farmacológicas em componentes presentes no veneno.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*Quem voltando a fazer o caminho velho aprende o novo, pode considerar-se um*

*mestre*

*Confúcio*

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.** v.21, p.220-231, 2007.

ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F.; KERNTOPF, C.M.; LESSA, R.D.; SOUSA, C.M.; MARTINS, R.D.; SOUSA, D.F.; QUEIROZ, M.G.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v.46, p.271-276, 2005.

ALMEIDA, R. A. M. B.; OLIVO, T. E. T.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; SOUZA, L. R.; MARTINS, J. G.; HASHIMOTO, M.; FABRIS, V. E.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARREVIERA, B. Africanized honeybee stings: how to treat them. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(6): 755-761, Nov-dez, 2011.

ANTONICELLI, L.; BILO, M. B.; BONIFAZI, F. Epidemiology of Hymenoptera allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** v.2, p.341-346, 2002.

AWE, S. O.; ADEAGBO, S. O. Vascular  $\alpha$ 1-adrenoreceptors in isolated perfused rat kidney: influence of ageing. **Autonomic e Autacoig Pharmacology**, 27:19-26, 2007.

AZEVEDO, R. V.; PAIVA, R. B.; ADES, FELIPE.; DAVID, C. M. Poisoning Syndrome due to 2.000 stings of Africanized honeybees. **RBTI**, v. 18, n. 1, 2006.

BARANY, M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. San Diego, **CA: Academic**, 1996.

BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. **Ed. EPUC**, Rio de Janeiro, 1994.

BARRAVIERA, B. Acidentes por abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: **Ed. De Publicações Científicas**, p. 339-344, 1994.

BIOLOGIA E SAÚDE. Guia do estudante. Editora Abril. Disponível em:<

[http://www.guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia\\_4333039.shtm](http://www.guiadoestudante.abril.com.br/universidades/curtaduracao/materia_4333039.shtm)> Acesso em: 17 Out. 2009.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n.3, 2002.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública. SVS/MS, ano 9, nº 1, 2009.

BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, 61:85-115, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo. Brasil registra 90 mil casos de intoxicação. 2005. Disponível em:<  
<http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=112>> Acesso em: 04 Out. 2007.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. – Brasília, 2001.

BHOGAL, N.; BALLS, M. Translation of new technologies: from basic research to drug discovery and development. **Curr. Drug Discov. Technol.**, v.5, n.3, p.250-62, 2008.

BUCHMANN, S. L.; G. P. NABHAN. The Forgotten Pollinators. **Washington**, Island, 1996.

CAMARGO, J.M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo: Ceres, 252 p, 1972.

CHAPMAN, E.F. The insects: structure and function. **Cambridge University Press**, New York, 4 ed , p.918, 1998.

CHI, J. Y. Estudo da imunidade adquirida a veneno de abelha (*Apis mellifera*) em apicultores. **Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo**. São Paulo, 1995.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C. Glândulas exócrinas das abelhas. **Editora FUNPEC**, Ribeirão Preto, 181 p, 2002.

DADE, H.A. Anatomy and dissection of the honeybee. Oxford: International Bee Research Association, 1994. 158p. DE JONG, D. O comportamento das abelhas africanizadas nas Américas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1, 1994, Ribeirão Preto. **Anais... Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo**,p.80-87, 1994.

DAHER, E. F.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, L. S. V.; SILVA, E. M. B.; MORAIS, T. P. Acute renal failure following bee stings. **Case reports**, 42(2):209-212, 2009.

DE MELLO, M. H.; DA SILVA, E. A.; NATAL, D. Africanized bees in a metropolitan area of Brazil: Shelters and climatic influences. **Rev Saude Publica**, 37:237-41, 2003

EATON, D.C.; POOLER, J.P. **Fisiologia Renal de Vander**. Editora Artmed. Porto Alegre, 6 ed, 2008.

ESHER, S. H. G.; CASTRO, A. P. B. M.; CROCE, J.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. F. M.; KALLI, J. E.; CASTRO, F. F. M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.** Saint Louis, v. 107, n.2, p.375, 2001.

FREE, J.B. A organização social das abelhas (Apis) . **EDUSP-SP**, p79, 1980.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.** 24: 163-169, 1965;

FERREIRA, D. B.; CODTA, R. S.; OLIVEIRA, J. A. M. D.; MUCCILLO, G. An infarct-like myocardial lesion experimentally induced in Wistar rats with Africanized bee venom. **J. pathol**, v. 177, n.1, p. 95-102, 1995.

FIGHERA, R.; SOUZA, T.; BARROS, C. Acidente provocado por picada de abelhas como causa de morte em cães. **Ciência Rural**, 37:590-593, 2007.

FRANÇA, F. O.; BENVENUTI, L. A.; FAN, H.W.; Dos SANTOS, D.R.; HAIR, S.H.; PICCHI-MARTINS, F.R.; CARDOSO, J.L.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; WARRELL, D.A. Severe and fatal mass attacks by "killer" bees (Africanized honey bees – *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **Q.J.Med.** 87, 269-282, 1994.

FREITAS, G. C. C.; OLIVEIRA, A. E.; FARIAS, J. E. B.; VASCONCELOS, S. D. Acidentes por aranhas, insetos e centopéias registrados no centro de assistência toxicológica de Pernambuco (1993 a 2003). **Rev. Patol. Trop.**, v. 35, p.148-156, 2006.

FONTELES, M. C. COHEN, J.J., BLACK, A.J.; WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.** v. 244, p.235-246, 1983.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera stings. **Clin. Tech Small Anim Pract.** v. 21 (4), p. 194-204, 2006.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Acidentes por himenópteros. 2005. Disponível em: < <http://www.funasa.gov.br/start.htm?sid=112> > Acesso em: 17 Out. 2009.

GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Helth. **Cad. Saúde Públ.** 11: 495-500, 1995.

GARCIA, F. R. M. Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas. **Porto Alegre: Rígel**, 1999.

GRIESBACKER, T.; ALTHUBER, P.; ZENZ, M.; RAINER, L.; GRIENGL, S.; LEMBECK, F. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur. J. Pharmacol.** v. 351, p. 95-104, 1998.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. R.; CASTRO, L.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, 48, 44-54, 2006.

GUIDO, RAFAEL V. C.; ANDRICOPULO, ADRIANO D.; OLIVA, GLAUCIUS. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av. [online]**. v.24, n.70, p. 81-98, 2010.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. **Mem. Inst. Butantan.** v. 51, p. 211-223, 1989.

HABERMANNE. Bee and wasp venoms. **Science.** v. 177, p. 314-322, 1972.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. S. Citrat, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid Res.** v.9, p.667-668, 1968.

HARVES, A.D.; MILLIKAN, L.E.; Current concepts of therapy and pathophysiology in arthropod bites and stings Part 2. **Insects Int J Dermatol.** V.14,p.621-34, 1975.

HERMAN, H.R. Social Insects. vol. I, II, III. **Academic Press.** USA, 1982.

HUNT, J. H.; BAKER, I.; BAKER, H. G. Similarity of amino acids in nectar and larval saliva: the nutritional basis for trophallaxis in social wasps. **Evolution.** v. 36, p.1318-1322, 1982.

JAISON, P. Social Insects in the Tropics. **Université Paris - Nord.** France, 1982.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension.** v. 35, p. 173-178, 2000.

LALLEMENT, G.; FOSBRAEY, P.; BAILLE, LE CROW, V.; TATTERSALL, J. E. H.; BLANCHET, G.; WETHERELL, J. R.; RICE, P.; PASSINGHAM, S. L.; SENTENAC-ROUMANOU, H. Compared toxicity of the potassium channel blockers, apamin and dendrotoxin. **Toxicology,** v.104, n.1-3, p. 47-52, 1995.

LIMA, M. A. P.; de LIMA, J. R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sócias (HYMENOPTERA, VESPIDAE) no Campus da UFJF, Juiz de Fora. **Rev. Bras. Zociênocr.,** v. 2, n. 1, 2000.

LIU, S.; WANG, F.; TANG, L.; GUI, W.; CAO, P.; LIU, X.; POON, A. P.; SHAW, P.; JIANG, T. Crystal structure of mastoparan from *Polistes jadwagae* at 1.2 Å resolution. **Journal of Structural Biology**. v. 160, Issue 1, p. 28-34, 2007.

LEÃO, R. N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. **Instituto Evandro Chagas. UEPA**, p. 785-797; 1997.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potencial of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 2, n. 10, p.790-802, 2003.

MARSH, N. A.; WHALER, B. C. The effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom and two of its constituents, melittin and phospholipase A<sub>2</sub>, on the cardiovascular system of the rat. **Toxicon**, v. 18, p. 427-435, 1980.

MEBS, D. Venomous and Poisonous Animals: a Handbook for Biologists, Toxixologists, Physicians and Pharmacists. **Ed. CRC Pres**, 2002.

MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**. v.26, p.23-32, 2006.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; Dos SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 114, p. 171-183, 2007.

MELLO, M. H. S. H.; SILVA, E. A.; NATAL, D. Africanized bees in a metropolitan área of Brazil: shelters and climatic influences. **Rev. Saúde Pública**. 37 (2):237-41, 2003.

MEYER, C.R.; WIESE, H. Breves noções de morfologia e anatomia da abelhas. In: WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre: Ed. Agropecuária, p.51-70, 1985.

MCGREGOR, D. D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. **J. Physiol**. v.177, p.21-30, 1965.

MÜLLER, U.; MOSBECH, H.; BLAAUW, P. ET AL. Emergency treatment of allergic reactions to Hymenoptera stings. **Clin. Exp. Allergy**, v. 21, p. 281-288, 1991.

NABIL, Z. I.; HUSSEIN, A. A.; ZALAT, S. M.; RAKHA, M. K. Mechanism of action of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom on different types of muscles. **Human & Experimental Toxicology**. V. 17, p. 185-190, 1998.

NAKAJIMA, T. Biochemistry of vespid venom. In: Insect and Arthropod Venoms. **Ed. Tu AT. Marcel Dekker: New York**, p.110-133, 1984.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Apicultura: manejo e produtos. **Jaboticabal: FUNEP**, 191p, 2002.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: Camargo, J. M. F. (org.): **Manual de Apicultura**. São Paulo, Ceres. pp.17-32, 1972.

OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Acidente humano por picadas de abelhas africanizadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33: 403-405, 2000.

OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Human accident for stings of Africanized bee. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33(4):403-405, 2000.

O'NEILL, K. M. Solitary wasps: behavior and natural history. **Comstock. Publishing Associates, USA**, 2001.

OWNBY, C. L.; POWEL, J. R.; FLETCHER, J. E. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**. V. 35, p. 67-80, 1997.

PALMA, M. S.; YAMAME, T.; CAMARGO, A. C. M. Biodiversidade: preservação e bioprospeção. Disponível em:<http://Comciencia.br/reportagem/biodiversidade/bio13.htm>. Acesso em 20 Maio de 2012.

PEDRO, E. Alergia e Insectos. Disponível em:<  
<http://www.medicoassistente.com/modules/smartsection/item.php?itemid=15>>  
Acesso em: 12 mar. 2012.

PEIXOTO, E. B. M. I. Modulação in vitro da função da barreira epitelial e integridade da junção de oclusão, em linhagem celular MDCK. **Dissertação (mestrado)** Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 100f, 2003.

PEREIRA, V. S.; SANTOS, G. M. M.. Diversity in Bee (Hymenoptera: Apoidea) and Social Wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae) Community in “Campos Rupestres”, Bahia, Brazil. **Neotropical Entomology**. v. 35 (2), p.165-174, 2006.

PENTEADO, J. O. P.; OLIVEIRA, C. H.; D'ANGIERI, A.; GRAUDENZ, G. S.; MASSUCATO, A. E.; CASTRO, A. B.; CASTRO, E. 3200 picadas de abelhas africanizadas. **RBTI**, v. 15, n. 4, 2003.

PIEK, T. Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms. **Toxicon**, v. 29, p.139-149, 1991.

SANTOS, G. M. M. Comunidades de vespas sociais (Hymenoptera – Polistinae) em três ecossistemas do estado da Bahia, com ênfase na estrutura da guilda de vespas visitantes de flores de caatinga. **Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo**, 2000.

SCHRIER, W. R.; WANG, W.; POOLO, BRIAN.; MITRA, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J. Clin. Invest.** v. 114, p.5-14, 2004.

SCHMIDT, J. O. Allergy to Hymenoptera venoms In: PIEK, T. Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects. **London Academic Press**, p. 509-546, 1986.

SCHWINN, D.A.; PRICE, D.T.; NARAYAN, P.  $\alpha$ 1-Adrenoreceptor subtype selectivity and lower urinary tract symptoms. **Mayo Clin Proc.** 79(11), 1423-34, 2004.

SCHUMACHER, M, J.; EGEN, N. B. Significance of Africanized bees for health. **Arch Intern Med**, 155: 2038-43, 1995.

SERT, M.; TETIKER, T.; PAYDAS, S. Rhabdomyolysis and acute renal failure due to honeybee stings as an uncommon cause (letter). **Nephron**, 65:647, 1993.

SILVA, E. C. Caracterização de toxinas presentes em peçonhas de vespas. 2003. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas**, 2003.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: Sistemática e identificação – **Depósito Legal na Biblioteca Nacional**. Belo Horizonte, 1ª edição, 2002.

SOARES, A. M. Toxinologia e Biossegurança. **Aplicações Biotecnológicas de Toxinas Naturais e Modelos Sintéticos**. 2005. Disponível em: <<http://sistemas.usp.br:8080/fenixweb/fexDisciplina?sgldis=6045824>>. Acesso em: 19 fev. 2007;

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v.134, p.201-234, 1999.

SOUSA, D. F. Estudos das alterações renais e vasculares promovidas pelo veneno total de *Bothrops lutzi*. Tese de Doutorado, 2010.

SPRADBERY, J. P. WASPS – An Account of the Biology and natural History of Solitary and Social wasps. **London: (s.n)**, 1973.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SHUWARTZ, R. A. Insect Sting reactions to bees, wasp and ants. **Int. J. Dermatol.**, v. 44, p.91-94, 2005.

STRASSER, R. H. IHL-VAL, R., MARQUETANT, R. Molecular Review: Molecular biology of adrenergic receptors. **J. Of. Hypert**, 10:501-506, 1992.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. v.27, p.201-206, 2003.

WILSON, E. O. the insects and man. *In*: SAIDEMBERG, N. B. B. Efeito das Interações Peptídeo-Peptídeo e peptídeo-membrana nas Atividades Funcionais de Toxinas peptídicas do Veneno da Vespa Social *Agelais pallipes pallipes*

(Hymenoptera, Vespidae). **Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2007.**

YU, L.; SANTOS, B. F.; BURDMANN, E. A.; SUASSUNA, J. H. R.; BATISTA, P. B. P. Insuficiência renal aguda. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de nefrologia/Comitê de Insuficiência Renal Aguda da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007.**

YU, Y.; DEWECK, A. L.; STADLER, B. M.; MÜLLER, U. Anti-IgE autoantibodies and bee-sting allergy. **Allergy**, v. 50, n. 2, p. 119-125, 1995.

TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; BERGER, M.; DE OLIVEIRA, S.K.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; GUIMARÃES, J.A. Melittin-induced platelet signaling and aggregation. **Biochemical and Biophysics Research Communications**. 2006.

THIRUVENTHIRAN, T.; GOH, B. L.; LEONG, C. L.; CHEOH, P. L.; LOOI, L. M.; TAN, S. Y. Acute renal failure following multiple wasp stings. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 14, p. 214-217, 1999.

VANHOLDER, R.; SEVER, M. S.; EREK, E.; LAMEIRE, N. Rhabdomyolysis. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 11, p. 1553-1561, 2000.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EUCLAIRE, M. F.; BOUGIS, P. E.; DE LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. Tityus serrulatus hypotensis: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.371, p.515-550, 2008.

VINHOTE, J.F.C.; TORRES, A.F.C.; DANTAS, R.T.; PRACIANO, T.P.; MENEZES, R.R.P.P.B.; SOUSA, D.F.; BRITO, T.S.; LIMA, F.J.B.; TOYAMA, M.H.; MAGALHÃES, P.J.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS-NUNES, A.M.C. Renal and calcium-dependent vascular effects of Polybia paulista wasp venom. **Jvat**. v.17, p.199-208, 2011.

VOGT, W.; PATZOR, P.; LEDE, L.; OLDIGS, H.D.; WILLIE, G. Synergism between phospholipase A2 and various peptides and reagents in causing haemolysis. **Naunyn Schmiedebergs Arch pharmacol**. v.264,p.442-7, 1970.

# ANEXOS

*Um sonho sonhado só é apenas um sonho, Um sonho sonhado junto é realidade.*

*Raul Seixas*

## ANEXO 1

### Chromatographic analyses of the bee venom

The purification of the bee venom sPLA2 was conducted in two chromatographic steps of the reversed-phase HPLC. Previously, the honey bee whole venom was dissolved in saline 0.9% at a concentration of 10 mg / mL in a final volume of 20 ml, which it was kept on constant shaking at 14 ° C and then the proteins contained in the venom was precipitated with a pure acetone for 24 hours to obtain the protein extracta that was then dried and stored for the fractionation of sPLA2, which was happen in two chromatographic steps of reversed-phase HPLC.

In the first step, the venom was fractionated on a molecular exclusion HPLC column, using a Tricon column (1 x 60 cm) previously packed with Superdex 75 resin. The column was attached to the semi-preparative on the reversed-phase HPLC and was equilibrated with 0.2M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 that was pumped to the chromatographic system at a flow rate of 0.6mL / min for 60 minutes. The honey bee venom extract, approximately 15 mg of was dissolved in 250 µL of buffer, which was homogenized and centrifuged at 4500xg for 5 minutes and filtered through 0.45µm filter and then applied millex column. Fractionation of the venom was performed at a constant flow of 0.3 mL / min and monitoring the race was held the absorbance of 280 nm and fractions collected in a fraction collector at a rate of 3 minutes per tube, which was submitted to tests to characterize the phospholipase A2 enzyme activity. The samples were characterized by electrophoresis.

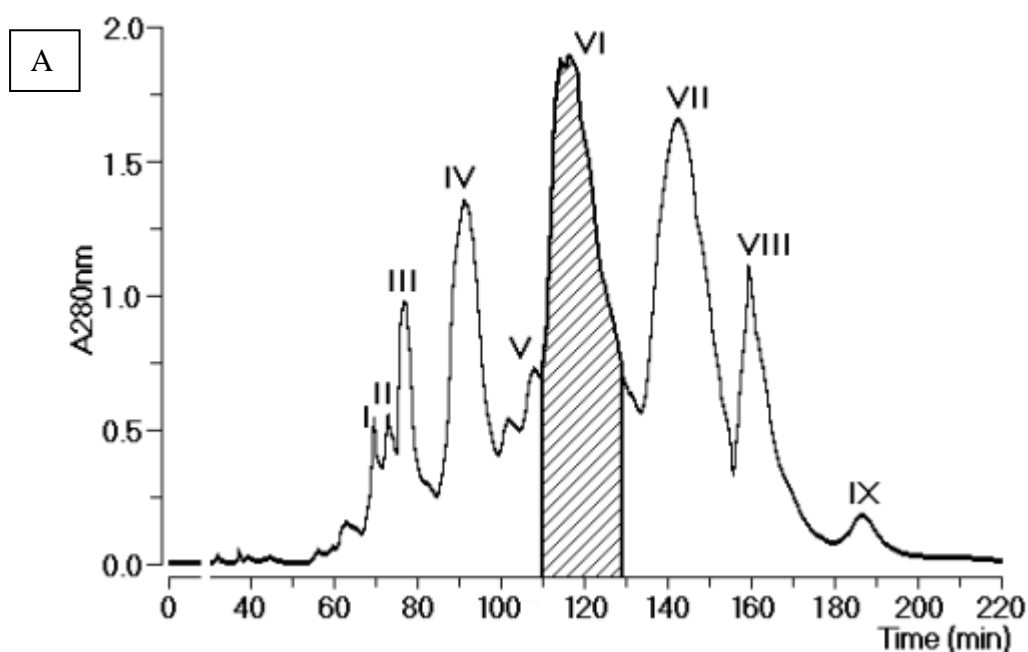
Once confirmed the enzymatic activity of phospholipase A2, this fraction was subjected to a new chromatographic step on the reversed-phase HPLC using a semi analytical column C5. In this step, the purification of sPLA2 was performed on C5 reverse phase column, which was equilibrated with buffer A (0.1% TFA) for 30 minutes at a flow rate of 1 ml / min. Samples of the fraction with phospholipase A2 activity (3 mg) was dissolved in 250 mL of buffer A and clarified and properly applied to the chromatographic column. The elution of sPLA2 was performed with a

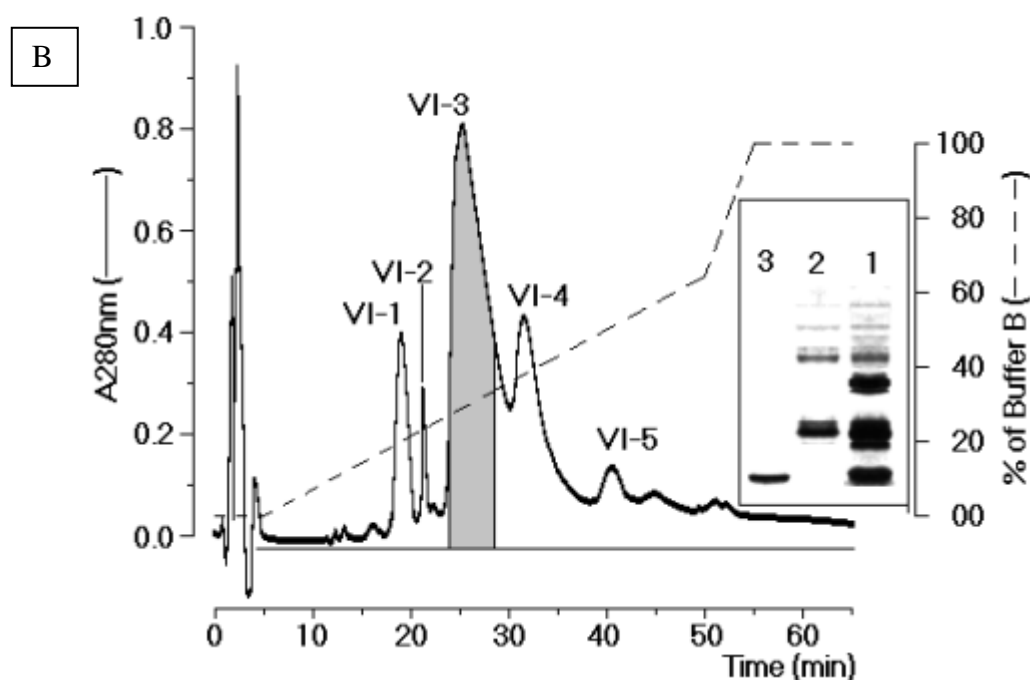
continuous linear gradient of buffer B (66% acetonitrile in 0.1% TFA) and monitoring of the chromatographic profile was 280nm. The samples were characterized by electrophoresis.

## RESULTS

### Chromatographic analyses of VAM

The figure 62, showed the fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone. The chromatographic profile presented in the figure 1.A showed the presence of 9 main fractions where the phospholipase A2 activity was found only in the fraction designated as VI. This fraction was subjected to a new chromatographic step in the reverse phase HPLC that was fractionated in five main fractions designated as VI-1 - VI-5 and only fraction VI-3 presented a phospholipase A2 enzymatic activity. The SDS-PAGE of this fraction showed a molecular mass of 15 kDa approximately (Figure 1.B).





**Figure 62:** **A:** Fractionation of whole protein extract from the honey bee venom precipitated with pure acetone. Shows the profile of the chromatographic fractionation of the extract of bee venom total molecular exclusion column using packed with Superdex75. The chromatographic run was carried out using a flow finds 0.6 mL/h and was monitoring the chromatographic run was carried out A280nm **B:** New chromatographic step in the reverse phase HPLC that was fractionated in five main fractions designated as VI-1 - VI-5. We see the results of fractionation of the enzyme fraction mind (PLA2) active in an ion exchange column. We observed the PAGE-SDS electrophoretic run of the purified proteins. Fractions VI-3 was confirmed as sPLA2 by specific phospholipase A2 assay and other fractions was recovered and its molecular mass was characterized by MALDI TOF.

## Mass spectrometry

The molecular mass of sPLA2 and melittin were determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Voyager-DE PROMALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). One microliter of samples in 0,1% TFA was mixed with 2 $\mu$ L of the matrix was  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, and 0,1 % TFA (v/v). The matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0,1% TFA (v/v). Ion masses were determined with an acceleration voltage of 25 kv, the laser operated at 2890  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>, a 300-ns delay, and the linear analysis mode.

**ANEXO 2**

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

**DECLARAÇÃO**

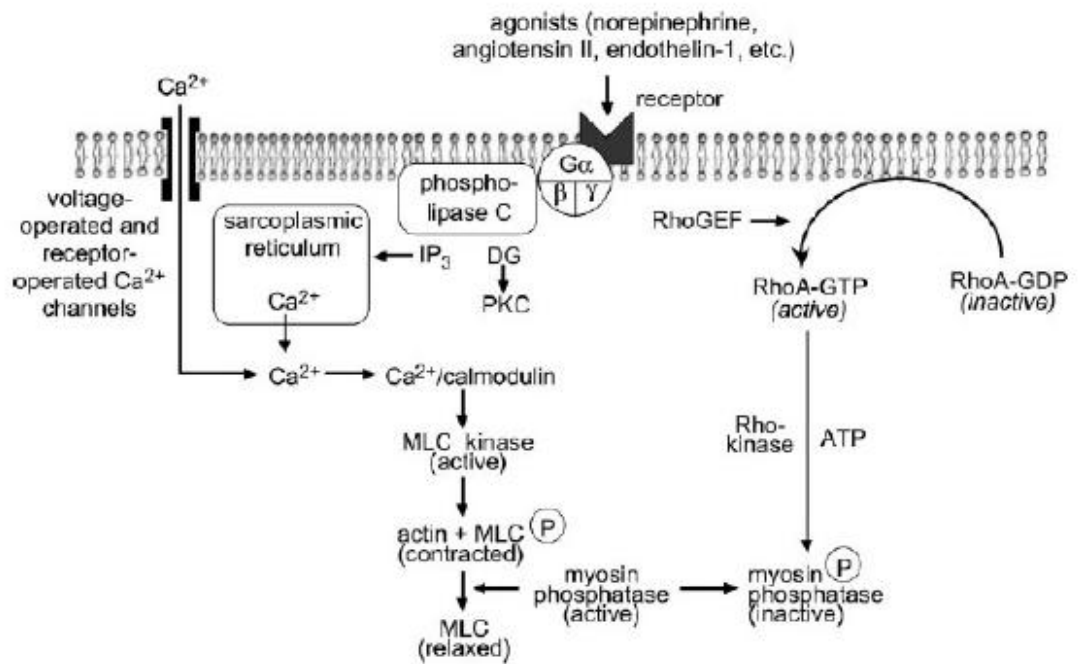
Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 01/2012, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS E VASCULARES INDUZIDOS PELO VENENO E FRAÇÕES ISOLADAS DE ABELHA DA ESPÉCIE APIS MELLIFERA”**, de responsabilidade de Helena Serra Azul Monteiro e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 14 de maio de 2012.

Fortaleza, 29 de maio de 2012

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

## ANEXO 3



**Figura 63. Mecanismos celulares envolvido na contração.** (Fonte: Webb, 2003).

## **ANEXO 4**

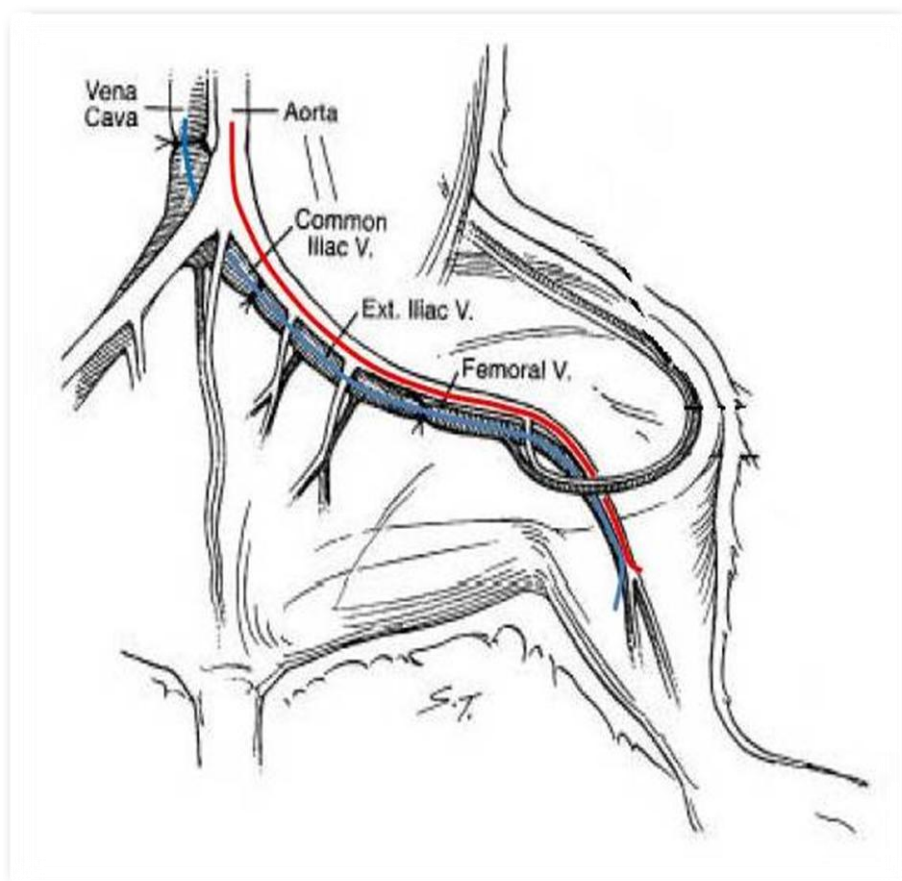
Conforme destacado na discussão dos resultados, segue a metodologia e o resultado do screen da pressão arterial média.

### **EFEITOS NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA DE RATOS ANESTESIADOS**

#### **METODOLOGIA**

##### **Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) e mantidos em decúbito dorsal. A traquéia foi isolada e uma curta cânula de polietileno (PE120) foi inserida nos animais por meio de traqueostomia, permitindo um fluxo respiratório espontâneo e a fácil aspiração de eventuais secreções brônquicas (Figura 64).



**Figura 64. Localização anatômica da artéria e veia femoral e posicionamento dos cateteres arterial (vermelho) e venoso (azul).**

Após a traqueostomia, dois cateteres de polietileno (PE10 conectado a PE50) pré-enchidos com heparina ( $500 \text{ UI.mL}^{-1}$  em salina isotônica) foram implantados na aorta abdominal para registro da pressão arterial média (P.A.M), frequência cardíaca(F.C) e eletrocardiograma(ECG). Na veia cava inferior (para administração de drogas), ambos 1 cm abaixo da artéria renal, conforme técnica descrita previamente (Lahlou *et al.*, 1999 apud SIQUEIRA, 2005).

## Sistema de aquisição de dados

No momento do experimento, o cateter aórtico foi acoplado a um transdutor de pressão piezo-elétrico (Braile BXS<sub>N</sub>) acoplado ao sistema de amplificação de sinal com interface USB (DATAQ DI-148U) e utilizando o software de aquisição de dados WinDaq/Lite. A P.A.M, ECG e a F.C. foram diretamente calculadas pelo software.

## Procedimento experimental

A administração intravenosa do veneno de *Apis mellifera* foi sempre efetuada após um período de estabilização da P.A.M., ECG e da F.C. Tais parâmetros foram registrados por períodos de 5 a 10 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. Quando foram administradas injeções subsequentes do veneno os valores da P.A.M. foram acompanhados até que retornassem aos seus respectivos níveis de controle (SIQUEIRA, 2005). As doses do veneno foram escolhidas baseadas na literatura e em experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa.

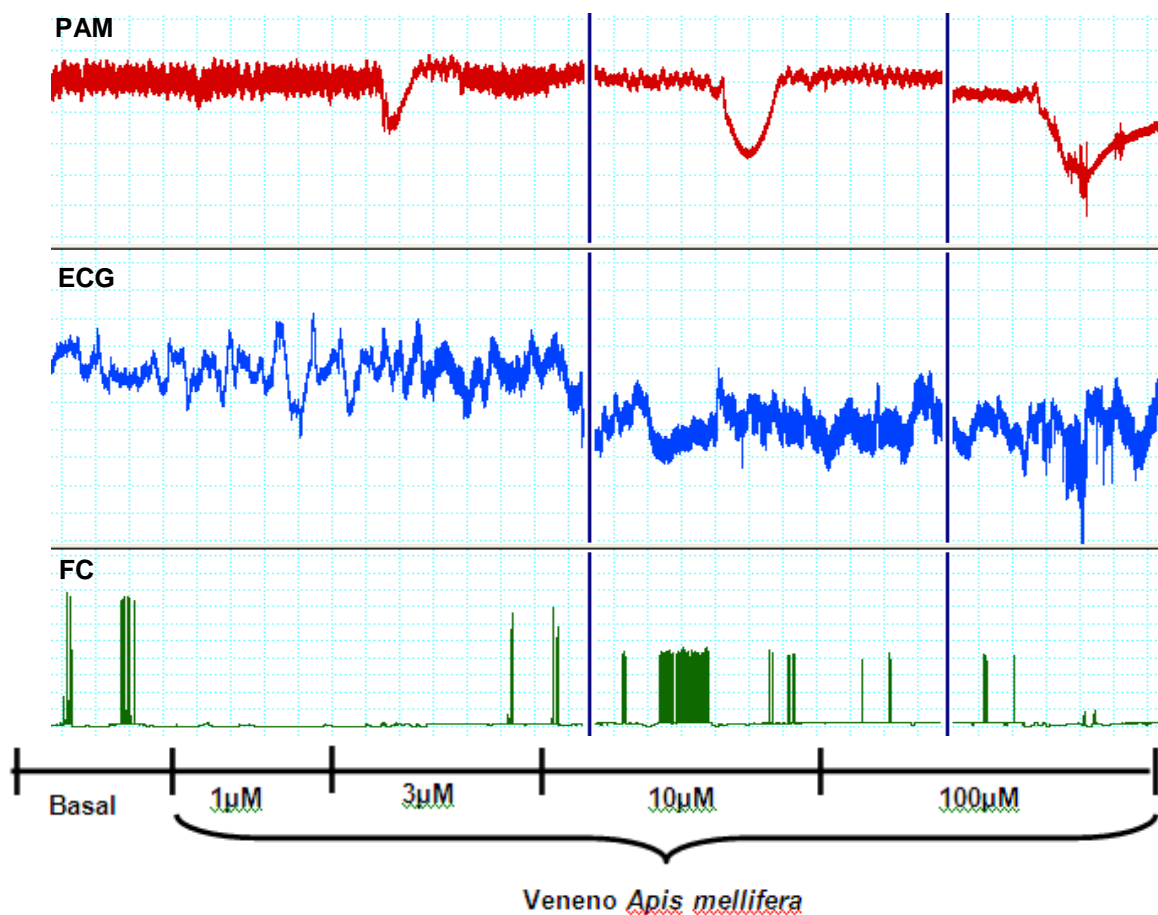
Ao término dos experimentos os animais foram sacrificados por overdose de tiopental sódico por via intravenosa.

## Grupos experimentais

### ❖ Relação dose-efeito

Para estabelecer a relação dose-efeito, os animais receberam doses crescentes, em bolus, do veneno de *Apis mellifera* (1, 3, 10, 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). O curso temporal das variações de pressão arterial média (P.A.M), eletrocardiograma (ECG) e frequência cardíaca (F.C) foi registrado após a administração.

## RESULTADO



**Figura 65.** Traçado do efeito de diferentes concentrações de *Apis mellifera* (1-100µM) na pressão arterial de ratos “in vivo”. Observa-se a seqüência de eventos do protocolo com a escala de tempo (min) e a pressão arterial média (PAM), eletrocardiograma (ECG) e frequência cardíaca (FC).

**ANEXO 5****Trabalhos apresentados em congresso com o tema da tese:**

1. COSTA, P. H. S, SOUSA, P. C. P., SILVA NETO, A.G.D, JORGE, A. R. A, H.S.A.MONTEIRO. ESTUDO DOS EFEITOS RENAIIS DO VENENO TOTAL DE APIS MELLIFERA IN: XXX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2011, FORTALEZA.
2. SOUSA, P. C. P., BRITO, T. S., SILVA NETO, A.G.D, D.F. SOUSA, MARINHO, A. D., MAGALHAES, P. J. C., M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. VASOCONSTRICTOR EFFECTS OF THE VENOM OF APIS MELLIFERA IN ISOLATED RAT AORTA ARE PROMOTED BY ITS FRACTIONS PLA2 AND MELITTIN IN: FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2011, RIO DE JANEIRO.
3. SOUSA, P. C. P., H.S.A. MONTEIRO. VENENO DE ABELHA AFRICANA (APIS MELLIFERA): EFEITOS VASOCONSTRICTOR EM AORTA ISOLADAS DE RATOS. IN: II WORKSHOP NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA, 2011, FORTALEZA.
4. SOUSA, P. C. P., BRITO, T. S., R.M. XIMENES, D.F. SOUSA, MARINHO, A. D., MAGALHAES, P. J. C., M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO.EFEITO VASOCONSTRICTOR DO VENENO DE APIS MELLIFERA EM AORTA ISOLADA DE RATO IN: V REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE 2010), 2010, ARACAJU.
5. SOUSA, P. C. P., FEITOSA, A. C.S, D.F. SOUSA, R.S. ALVES, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. EVALUATION OF EFFECTS OF APIS MELLIFERA BEE VENOM ON ISOLATED RAT KIDNEY IN: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA, 2010, FORTALEZA-CE.

6. SOUSA, P. C. P., FEITOSA, A. C.S, D.F. SOUSA, R.M. XIMENES, R.S. ALVES, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO. STUDY OF THE RENAL EFFECTS OF APIS MELLIFERA VENOM IN: XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 2010, ARAXÁ.
  
7. SOUSA, P. C. P., J.F. CHAGAS, A.R.C. JORGE, F.C.M.SOUSA, D.F. SOUSA, R.S. ALVES, J.P.C. BARBOSA, M.H. TOYAMA, H.S.A. MONTEIRO, A.M.C. MARTINS. EVALUATION OF EFFECTS FROM POLIBYA PAULISTA WASP VENOM ON ISOLATED RAT KIDNEY IN: XVI WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2009.
  
8. C.A.V.G. LEITE, R.S. ALVES, R.M. XIMENES, A.R.C. JORGE, D.F. SOUSA, MARINHO, D., SOUSA, P. C. P., A.T.B MENDONÇA, DAHER, E., H.S.A. MONTEIRO. FUROSEMIDE EFFECTS ON ISOLATED PERFUSED RAT KIDNEY: A PRELIMINARY STUDY IN: 41º CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL - BRADICININA 60 ANOS, 2009, RIBEIRÃO PRETO.