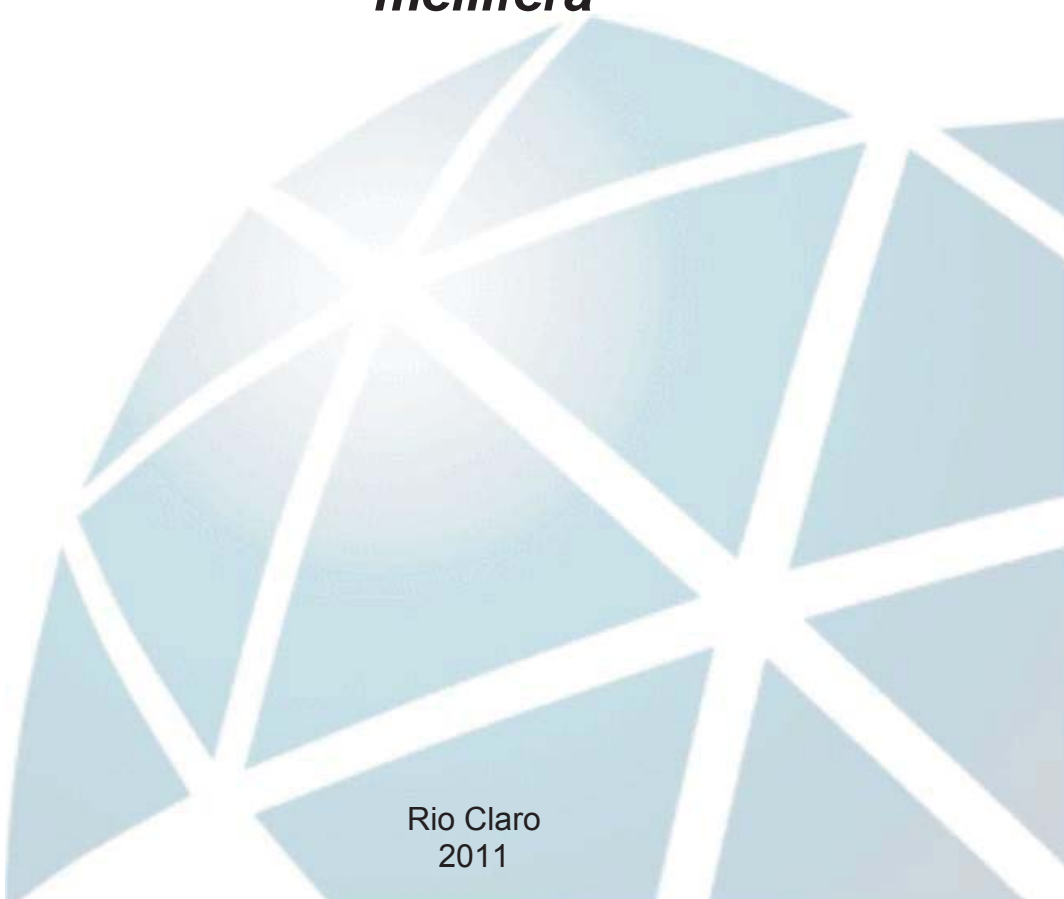

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NOTURNO

DANILO MOURELLE

**Estudos sobre atividade
nociceptiva/antinociceptiva de peptídeos
isolados do veneno bruto de abelha *Apis
mellifera***



Rio Claro
2011

DANILO MOURELLE

Estudos sobre atividade nociceptiva/antinociceptiva de peptídeos
isolados do veneno bruto de abelha *Apis mellifera*

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Co-orientador: Dra. Patrícia Brigatte

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Rio Claro
2011

615 Mourelle, Danilo
M931e Estudos sobre atividade nociceptiva/antinociceptiva de
peptídeos isolados do veneno bruto de abelha *Apis mellifera* /
Danilo Mourelle. - Rio Claro : [s.n.], 2011
40 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Mario Sergio Palma
Co-Orientador: Patrícia Brigatte

1. Farmacologia. 2. Secapina. 3. Hiperálgia. 4. Edema.
5. Dor. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Sumário

1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
2.1. <i>Filo Arthropoda - Ordem Hymenoptera</i>	5
2.2. <i>Abelhas</i>	5
2.3. <i>Veneno de Abelha</i>	6
2.3.1. <u>Constituintes do veneno</u>	6
2.3.2. <u>Efeitos antinociceptivos (analgésicos) do veneno de abelha</u>	8
2.3.3. <u>Efeitos nociceptivos (dolorosos) do veneno de abelha</u>	9
2.4. <i>A secapina</i>	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. <i>Objetivos Específicos</i>	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. <i>Síntese manual de peptídeos em fase sólida</i>	13
4.2. <i>Atividades farmacológicas</i>	13
4.2.1. <i>Animais</i>	13
4.2.2. <u>Avaliação da sensibilidade dolorosa</u>	14
4.2.3. <i>von Frey Eletrônico</i>	14
4.2.4. <u>Edema de Pata</u>	14
4.2.5. <u>Tratamentos Farmacológicos</u>	15
4.2.6. <u>Hemólise</u>	15
4.2.7. <u>Desgranulação de mastócitos</u>	16
4.2.8. <u>Quimiotaxia</u>	17
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1. <i>Hemólise</i>	19
6.2. <i>Desgranulação de Mastócitos</i>	21
6.3. <i>Atividade Quimiotática</i>	22
6.4. <i>Atividade Hiperalgésica e Inflamatória</i>	23
6.5. <i>Tratamentos Farmacológicos</i>	26
7. DISCUSSÃO	29
8. CONCLUSÃO	33
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. RESUMO

O veneno bruto de abelha *Apis mellifera* é composto por uma série de peptídeos, entre eles a melitina, adolapina, procamina A e B, apamina, tertiapina, secapina, peptídeos desgranuladores de mastócitos, entre outros. Estas substâncias apresentam diversos efeitos já estudadas, dentre elas, efeitos antitumorais, atividades hiperalgésicas ou analgésicas, inflamatórias ou anti-inflamatórias. O peptídeo secapina foi descrito há 35 anos atrás e, posteriormente nada mais foi relatado na literatura. Portanto, este é o primeiro trabalho que visa caracterizar o possível efeito hiperalgésico e/ou analgésico, inflamatório e/ou anti-inflamatório, bem como analisar alguns dos mecanismos envolvidos nestes fenômenos. Para tanto, para caracterizar os possíveis efeitos hiperalgésicos/analgésicos da secapina, em diversas doses (0,005, 0,35, 1, 2, 10 e 30 µg / 50 µL), foi utilizado o teste de avaliação da sensibilidade dolorosa denominado teste do von Frey eletrônico. Para a caracterização do efeito inflamatório/anti-inflamatório da secapina foi utilizado o paquímetro digital determinando o volume da pata dos animais. Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos, foram realizados tratamentos farmacológicos utilizando indometacina, zileuton e zafirlukaste (inibidores da síntese da via da ciclooxigenase, lipoxigenase e antagonista de receptor de leucotrieno, respectivamente). Os resultados mostraram que a secapina, em todas as doses testadas, induziu efeito hiperalgésico a partir dos primeiros 15 minutos após a administração deste peptídeo. Este efeito hiperalgésico persistiu por até 240 minutos nas doses de 0,005 e 0,35 µg/ 50µL e 480 minutos nas doses de 1 e 2 µg/ 50µL. O efeito edematogênico da secapina na dose de 0,35 µg/50 µL foi iniciado nos primeiros 15 minutos após a administração da secapina e persistiu por até 120 minutos, sendo comparado ao efeito edematogênico promovido pela carragenina (controle positivo) nos primeiros 15 minutos do teste. Ainda, o zileuton e o zafirlukaste, inibidor da via da lipoxigenase e antagonista de receptor de leucotrieno, reverteu totalmente a hiperalgesia e edema induzido pela secapina na primeira hora do período experimental quando comparado ao grupo controle. A indometacina, inibidor da via da ciclooxigenase, não foi capaz de reverter a hiperalgesia e edema induzidos pela secapina. Estes dados, analisados em conjunto, mostram que a secapina contribui para a dor e a inflamação induzidas pelo veneno da espécie de abelha *Apis mellifera* e mediadores lipídicos estão envolvidos nestes fenômenos.

Palavras-chave: veneno de abelha, secapina, hiperalgesia, edema, dor

2. INTRODUÇÃO

2.1. *Filo Arthropoda - Ordem Hymenoptera*

Os artrópodes apresentam o maior grupo de animais encontrados na superfície terrestre, tanto numericamente quanto em biomassa. Compreendem cerca de 85% de todas as espécies já descritas, sendo este número superior a 1 milhão de espécies. A principal característica desse filo é a presença de um exoesqueleto articulado composto por quitina. Este filo é composto pelas classes dos crustáceos (lagostas, camarões e etc.), diplópodes (pioelhos-de-cobra), queliceratos (aranhas e escorpiões) (MALASPINA et al., 2009).

Dentro do filo dos artrópodes, os insetos são os animais terrestres mais numerosos com uma distribuição cosmopolita (EISNER e WILSON, 1997); existentes a pelo menos 300 milhões de anos, os insetos são encontrados com supremacia em todas as terras continentais (CHAUD-NETTO et al., 1994). Uma estimativa, segundo Meinwald e Eisner (1995), é de que existiria cerca de 200 milhões de insetos para cada ser humano vivo. Esse grande sucesso evolutivo dos insetos acredita-se ser devido ao desenvolvimento de asas o que lhes permitem atingirem novos habitats, tanto na busca de alimentos quanto para refúgios de inimigos.

Dentro da classe dos insetos, a ordem Hymenoptera engloba as abelhas, formigas e vespas e é considerada uma das maiores ordens. A ordem possui aproximadamente 115.000 espécies (HANSON & GAULD, 1995), sendo estas distribuídas em 99 famílias (GOULET e HUBER, 1993).

São várias as funções realizadas por substâncias químicas de origem dos Hymenoptera, entre elas podemos citar: matar a presa, substâncias irritantes para afugentar inimigos, feromônios para os mais diversos tipos de comunicação (McCORMIC e MEINWALD, 1993).

2.2. *Abelhas*

Pertencentes à ordem dos Hymenoptera, são conhecidas aproximadamente 15 espécies de abelhas, sendo que destas, 15% são parasitas com larvas que se alimentam de hospedeiros e não transportam pólen. Por volta de 70% das espécies são solitárias, onde as fêmeas cuidam exclusivamente da própria vida e sem preposição de gerações. Apenas 5% das abelhas são sociais (MALASPINA et al., 2009).

O grupo social mais importante das abelhas é o gênero *Apis*, também conhecido como as “abelhas de mel”. Inicialmente era um gênero restrito aos países do velho mundo até que a *Apis mellifera* foi introduzida nos outros países com o interesse comercial do mel. As abelhas africanizadas existentes no Brasil surgiram a partir de 1956, com a chegada da

subespécie *Apis mellifera scutellata* na cidade de Rio Claro/SP e desde então as gerações seguintes foram se alastrando por todo o país e hoje ocupam praticamente todo o continente americano, evitando apenas as regiões frias (MALASPINA et al., 2009).

2.3. Veneno de Abelha

2.3.1. Constituintes do veneno

Os constituintes ativos do veneno de abelha são principalmente: melitina (HABERMANN, 1954; NEUMANN e HABERMANN, 1954), apamina (HABERMAN e REIZ, 1965; SPOERRI et al., 1973, 1975), peptídeos MCD “*mast cell degranulation*” (desgranuladores de mastócitos) (FREDHOLM, 1966; BREITHAUPT e HABERMAN, 1968), minimina (LOWY et al., 1971), secapina (GAULDIE et al., 1978; HIDER e RAGNARSSON, 1981; XU e NELSON, 1993), melitina F (GAULDIE et al., 1978), cadiopep (VICK et al., 1974), tertiapina (MIROSHNIKOV et al., 1983), enzima fosfolipase A2 e adolapina (SHKENDEROV e KOBUROVA, 1982; KOBUROVA et al. 1984, 1985), entre outros.

A **melitina** é um peptídeo fortemente básico que apresenta 26 resíduos de aminoácidos (**G-I-G-A-V-L-K-V-L-T-T-G-L-P-A-L-I-S-W-I-K-R-K-R-Q-Q-NH₂**), e constitui aproximadamente 50% do veneno seco de abelha, apresentando algumas ações biológicas como interação com a superfície lipídica da membrana celular, atividade hemolítica, atividade antifúngica, antibacteriana (HABERMANN, 1972) e propriedade antitumoral (ORSOLIC et al., 2003; LIU et al., 2008ab). Esse peptídeo diminui a tensão superficial da água no nível da membrana plasmática, agindo como detergente natural, causando lise celular (especialmente dos mastócitos), seguida de liberação de histamina (PIEK, 1986). Acredita-se que a melitina pode ser a molécula responsável pelo efeito antinociceptivo e anti-inflamatório usado na acupuntura (apicupuntura – técnica utilizada na terapia com veneno de abelha) (SON et al., 2007). Porém, alguns dados da literatura também mostram a melitina possui efeito nociceptivo (BRIGATTE et al., 2011).

Segundo Talbot et al., (1982) a melitina pode se apresentar nas formas mono e tetramérica e sua ligação aos fosfolipídios de membranas depende do estado de associação e da concentração micelar crítica. Enquanto não há interação observada entre a melitina monomérica e os fosfolipídios livres, a melitina tetramérica pode se ligar aos lipídeos livres para formar micelas mistas, o que pode causar uma perturbação no caso de interação com fosfolipídios de membrana.

A **apamina** é um polipeptídeo neurotóxico formado por 18 resíduos de aminoácidos (**C-N-C-K-A-P-E-T-A-L-C-A-R-R-C-Q-Q-H-NH₂**); compõe o veneno de abelha em aproximadamente 2% da massa seca do veneno de abelha, possui ação inibitória seletiva de canais de potássio dependentes de cálcio, estando estes envolvidos na regulação do período de pós hiperpolarização e na frequência da geração de potencial de ação no Sistema Nervoso Central (HUGUES et al., 1982). Foi descrito que no cérebro de rato há uma substância endógena equivalente a apamina que interage com os canais de potássio dependentes de cálcio (LAZDUNSKI et al., 1985). Quando administrada, a apamina atravessa a barreira hematoencefálica e induz hiperexcitabilidade (HABERMANN, 1972).

Os **peptídeos MCD** foram identificados por Fredholm (1966), como um polipeptídeo composto por 22 resíduos de aminoácido (**I-K-C-N-C-K-R-H-V-I-K-P-H-I-C-R-K-I-C-G-K-N-NH₂**); compõe aproximadamente 2-3% da massa seca do veneno de abelha. Também conhecido como peptídeo 401, os MCD recebem esse nome pela atividade em tecidos que é a desgranulação de mastócitos (BANKS e SHIPOLINI, 1986; JASANI et al., 1979). Alguns estudos relatam que os peptídeos MCD podem estar envolvidos na patogênese da epilepsia (BIDARD et al., 1989; IDE et al., 1989).

A **tertiapina** é um polipeptídeo de 20 resíduos de aminoácidos (**A-L-C-N-C-N-R-I-I-P-H-M-C-W-K-K-C-G-K-K-NH₂**), com duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteínas localizadas nas posições 3-13 e 5-17, representa cerca de 0,1% da massa seca do veneno de abelha, possui baixo potencial desgranulador de mastócitos. Ela foi comparada com as prostaglandinas nas mesmas condições (MIROSHNIKOV et al., 1983).

A **secapina** é um polipeptídeo com 25 resíduos de aminoácidos (**Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂**), representa cerca de 0,5% do peso seco do veneno da abelha. Não existem, até o momento, dados significativos sobre os possíveis efeitos farmacológicos da secapina. Os dados existentes na literatura referem-se apenas à sua estrutura (GAULDIE et al., 1978; BANKS e SHIPOLINI, 1986).

A **fosfolipase A₂ (PLA₂)** é uma enzima que compõe aproximadamente 11% da massa seca e apresenta efeitos nociceptivo e inflamatório. A PLA₂ é uma enzima que interage com fosfolípidios da membrana plasmática sendo responsável pela formação do ácido araquidônico, o qual é metabolizado para mediadores inflamatórios pelas vias da ciclooxigenase e lipoxigenase. Afeta a maioria das células responsáveis por processos nociceptivos como os astrócitos, neurônios e possivelmente as células da glia (SUN et al., 2004). Segundo Koumanov et al., (2003), a PLA₂ apresenta uma forte interação com a melitina o que pode potencializar ou inibir seus efeitos dependendo da relação

peptídeo/enzima. Ainda, de acordo com relatos de Sharma (1993), esta interação é a responsável pela citotoxicidade causada em células cancerígenas e, portanto um alvo importante a ser estudado pelos oncologistas.

2.3.2. Efeitos antinociceptivos (analgésicos) do veneno de abelha

O uso do veneno de abelha em terapias alternativas é bastante tradicional em vários países, sendo o mesmo utilizado para o tratamento de várias doenças, tais como artrite, tendinite, gota e esclerose múltipla. Em todos os casos, a intenção da aplicação desta terapia em portadores das enfermidades mencionadas acima é o alívio da dor e redução do processo inflamatório; tal terapia recebe o nome internacional de “bee venom therapy” (BVT), ou seja, terapia com veneno de abelha. (CHEN et al., 2010; SON et al., 2007).

São muitos os estudos referentes aos efeitos da BVT nas patologias citadas acima sendo muitos deles publicados, particularmente, no oriente (China e Coréia do Sul). De acordo alguns com trabalhos referentes a estudos clínicos com humanos (SON et al., 2007; LEE et al., 2005; LEE et al., 2008), a maioria dos estudos utiliza a acupuntura com veneno de abelha (ou apicupuntura) como metodologia da BVT. Essa metodologia se baseia em aplicar veneno de abelha diluído em diversos pontos do corpo humano utilizados na acupuntura tradicional.

Nos modelos de dor neuropática (dor causada por lesão nervosa, experimentalmente), a apicupuntura teve um efeito antinociceptivo de 5-45 minutos após uma única injeção no ponto Zusanli (localizado 5 mm distal e lateral do tubérculo anterior da tíbia) (ROH et al., 2004).

Já no ano de 1982, muitos trabalhos foram publicados demonstrando os efeitos da BVT nos modelos de artrite, uma patologia que além de causar muitas dores nas articulações, dificultando movimentos, também pode levar à morte (EISEMAN et al. 1982; SHKENDEROV e KOBUROVA 1982).

Em experimentos realizados por Kwon et al., (2001), a apicupuntura foi utilizada em estudos no modelo de artrite reumatoide em ratos. A apicupuntura foi administrada bilateralmente no ponto Zusanli e esta injeção do veneno de abelha reduziu significativamente o aumento do volume da pata, vocalização durante flexão e extensão do tornozelo inflamado, bem como a sensibilidade térmica e mecânica dos animais. Nesse mesmo estudo os autores mostraram que injeção subcutânea no dorso do animal (fora de um ponto utilizado na acupuntura), apresenta os mesmos efeitos relatados acima, mostrando, portanto, que o efeito antinociceptivo do veneno de abelha independe do ponto ou local de administração.

Nas várias substâncias algogênicas utilizadas para a indução de artrite reumatoide (carragenina, adjuvante de Freund, lipopolissacarídeos) o veneno de abelha apresenta um efeito antinociceptivo no controle dos sintomas desta patologia, tais como, controle da formação de edema e dores, esta antinocicepção se dá quando a administração do veneno ocorre no dia anterior à injeção do agente indutor da artrite mostrando um grande potencial preventivo deste veneno nesta patologia.

No trabalho de Chang e Bliven (1979) é relatado que uma única injeção subcutânea de veneno de abelha, no dia anterior ao agente indutor da artrite reumatoide, causa um retardo nos sintomas da doença por até 14 dias. Já em modelos onde o veneno de abelha foi administrado em animais com artrite já bem estabelecida (aproximadamente 16 dias após injeção de agente indutor), a administração diária do veneno de abelha resultou na diminuição da inflamação por aproximadamente 7 dias, sendo que a partir desse período os sintomas voltaram a se igualar ao grupo controle.

Ensaio realizados com humanos não têm mostrado grandes resultados, uma vez que existe dificuldade de se conduzir um grupo amostral abundante ou confiável (amostras mínimas de 10 indivíduos por grupo, uma média de menos de 20 com um máximo registrado de 40 pessoas por grupo). Outros aspectos que impedem a confirmação dos resultados são tratamentos concomitantes à apicupuntura, tais como: o uso de radiação infravermelho, compressas e terapia de exercícios físicos (LEE et al., 2008).

2.3.3. Efeitos nociceptivos (dolorosos) do veneno de abelha

Ainda, uma justificativa usada para os não adeptos da terapia com o veneno de abelha é o conhecimento de que ferroadas de abelhas e outros insetos Hymenoptera podem causar reações alérgicas, sistêmicas e até choque anafilático em pessoas sensíveis (KAY e LESSOF, 1992; ANNILA, 2000; BERNSTEIN et al., 2008; SIMONS et al., 2008). Estudos epidemiológicos mostram que em países em desenvolvimento quase 3% da população adulta já apresentaram reações a ferroadas de abelha enquanto que 25% obtiveram resultado positivo para risco de alergia no teste RAST (“*radioallergosorbent test*”) – teste alérgico. (GOLDEN, 1989).

Um segundo fato que diminui a aceitação da terapia por veneno de abelha é o conhecimento geral de que ferroadas causam grande dor e inflamação, e que quando ocorrem repetitivamente podem causar o desenvolvimento de sintomas de artrite, fato este que não foi totalmente esclarecido ou comprovado (CUENDE et al., 1999).

São vários os trabalhos publicados relatando efeitos nociceptivos com veneno de abelha, ou com um de seus constituintes isoladamente. Existem poucos estudos utilizando humanos e veneno de abelha. Este fato é devido a possíveis reações alérgicas e até casos de choque anafilático, como relatado acima. Portanto, a maioria dos trabalhos utiliza frações do veneno, assim como o publicado por Koyama et al., (2000), no qual sete pessoas testaram os efeitos da melitina. Foi usado uma escala subjetiva (0 a 10) para relatar a intensidade de dor onde 0 significa ausência de dor e 10 seria uma dor intolerável. Todos os indivíduos relataram que subdoses de melitina, administradas por via intradérmica, causam sensação de dor com nível maior ou igual a 8. Este efeito nociceptivo seria aliviado após aproximadamente 3 minutos.

Os trabalhos com veneno de abelha utilizando-se de modelos animais começaram a ser publicado a partir de 1996 com Lariviere e Melzack, onde doses de veneno bruto de abelha foram injetadas na pata traseira de roedores (ratos e camundongos). Estes animais apresentaram sinais de dores fortes entre 5 a 10 minutos após a injeção, seguidos por gradual queda dos sintomas até a primeira hora.

Os principais modelos de sensibilidade dolorosa utilizados para a determinação dos efeitos nociceptivos do veneno de abelha utilizam o calor ou uma força mecânica para indução de hiperalgesia térmica ou mecânica, respectivamente. Estudos realizados por Sumikura et al (2006), mostraram que o efeito nociceptivo apresentado é dependente do estímulo lesivo utilizado. Portanto, torna-se relevante entender o efeito observado a partir das diferenças nos modelos de sensibilidade dolorosa utilizados.

Muitos são os trabalhos que além da atividade nociceptiva, também estudam o processo inflamatório decorrente do veneno de abelha uma vez que segundo Lariviere e Melzack (1996) estudar apenas uma das atividades não apresenta um resultado conclusivo. Como exemplo, podemos citar o trabalho de Brigatte et al., (2011), onde foram estudadas as duas atividades para diversos peptídeos de veneno (abelha e vespas sociais neotropicais). Os autores mostraram a evolução do processo inflamatório e nociceptivo induzido quando injetado a melitina, composto majoritário do veneno de abelha, entre outras substâncias.

Hong e Abbott (1994) afirmam que injeções subcutâneas dos vários componentes do veneno de abelha não apresentam reações de longa duração na pata injetada, e isso se deve provavelmente às características químicas e biológicas desses peptídeos. Em testes feitos por Chen (2006) utilizando os quatro principais peptídeos presentes no veneno de abelha (melitina, apamina, peptídeo MCD e enzima fosfolipase A₂), foi mostrado que dentre estes

componentes apenas a melitina apresentou um efeito duradouro (48 horas), enquanto que os outros peptídeos apresentaram um efeito mais imediato (10 a 15 minutos) e menos duradouro.

2.4. A secapina

A secapina foi encontrada primeiramente por Gauldie et al., (1976), os autores propõem que a secapina representa 1% do veneno bruto de abelha. Os mesmo autores publicaram sua estrutura dois anos após sua identificação, demonstrando a seguinte sequência **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-P-V-NH₂)**, através da utilização métodos degradativos, como uso de tripsina e quimiotripsina (GAULDIE, 1978). Já em 1979, autores russos também publicaram uma sequência da secapina, utilizando a técnica de espectrometria de massas, a qual apresentava semelhança com o trabalho precursor até o resíduo de número 22, **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-L-V-P-NH₂)** (KUDELIN et al., 1979).

Esta diferença em relação à estrutura da secapina foi esclarecida com trabalhos publicados posteriormente. Lui e Vernon (1984) corroboram com o trabalho de Kudelin et al., (1979) uma vez que estes autores também encontraram uma sequência de 25 resíduos de aminoácidos, com a única diferença na posição do resíduo de número 23, onde se verificou isoleucina ao invés de leucina e estimou-se que a secapina corresponderia a 0,5% do total do veneno bruto de abelha **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂)**. Em 1984, Vlasak e Kreil, através de estudo com mRNA (Ácido Ribonucleico mensageiro) e cDNA (Ácido Desoxirribonucleico complementar), encontraram uma sequência de 77 resíduos de aminoácidos. Essa sequência foi então identificada como sendo a estrutura da preprosecapina: **(M-K-N-Y-S-K-N-A-T-H-L-I-T-V-L-L-F-S-F-V-V-I-L-L-I-I-P-S-K-C-E-A/-/V-S-N-D-R-Q-P-L-E-A-R-S-A-D-L-V-P-E-P-R/-/Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂)**. Os primeiros 32 resíduos corresponderiam à presecapina, ou seja, um peptídeo sinalizador. Os resíduos de números 33 a 52 corresponderiam a prosecapina e de 53 a 77 corresponderia, enfim, a sequência do peptídeo secapina (VLASAK, 1984). Matysiak et al., (2011) sequenciaram peptídeos presentes no veneno de abelha usando espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e nanoESI-QqTOF e identificaram o peptídeo secapina contendo a mesma sequência já anunciada por Lui e Vernon (1984) e Vlasak (1984).

Em trabalho recente desenvolvido por Briganti (2010), foi utilizado técnicas de espectrometria de massas do tipo IT-TOF, onde a sequência da secapina encontrada corrobora os dados obtidos por Lui e Vernon (1984) e Vlasak (1984). **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂)**.

Estudos realizados por Gauldie et al., (1976), evidenciaram que este peptídeo não possui atividade tóxica, uma vez que nem administrações de doses elevadas (até 80 mg/kg) da secapina em animais não foram capazes de determinar sua dose letal 50%. Os autores relataram que os animais apresentaram sinais de leve sedação com doses de 40 mg/kg, enquanto que em doses de 80 mg/kg foi evidenciado sinais de sedação após 15 minutos de sua administração, além de piloereção e hipotermia (GAULDIE et al., 1976).

3. OBJETIVOS

Considerando-se que pouco ou nada se conhece sobre as atividades farmacológicas da secapina, especialmente com relação aos processos algésico e inflamatório, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo a avaliação do efeito analgésico ou hiperalgésico, anti-inflamatório ou inflamatório do peptídeo secapina, um dos componentes do veneno de espécie de abelha *Apis mellifera*, buscando compreender melhor o efeito desta substância e seus possíveis mecanismos de ação.

3.1. *Objetivos Específicos*

Os objetivos específicos deste trabalho de pesquisa foram:

- a) Avaliar a atividade hemolítica da secapina;
- b) Avaliar a atividade desgranuladora de mastócitos da secapina;
- c) Avaliar a atividade quimiotática da secapina;
- d) Avaliar os efeitos hiperalgésicos/analgésicos, inflamatório/anti-inflamatório da secapina;
- e) Avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas ações acima relatadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Síntese manual de peptídeos em fase sólida

A síntese da secapina, a qual apresenta a seguinte sequência: **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂)**, foi realizada através do método manual em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil (estratégia Fmoc). Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM) com N-Hidroxibenzotriazol (NOVABIOCHEM) como agente ativador dos aminoácidos e N-Metilmorfolina (ALDRICH) como agente acoplante. Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado N-N-Dimetilformamida (SYNTH) e Piperidina (FLUKA), respectivamente. Todas as reações acima foram realizadas sob agitação mecânica em capela. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05). Após a secagem, foi feita a clivagem entre o peptídeo e a resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 94% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA) e Etanoditiol 1% (v/v) (ALDRICH). Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-peptídeo passou por uma centrifugação refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo. O peptídeo foi ressuspensionado em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754). O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS e sequenciamento por Química Degradativa de Edman em um sequenciador automático (SHIMADZU, modelo PPSQ-21A).

4.2. Atividades farmacológicas

4.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 27-30g fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista *campus* Botucatu. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de $20 \pm 3^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. O presente trabalho de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista *campus* Rio Claro (CEUA-IB-UNESP-CRC, Protocolo número: 1984) e obedeceram às normas propostas pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

4.2.2. Avaliação da sensibilidade dolorosa

Os animais foram submetidos, para avaliação da sensibilidade dolorosa, ao teste do von Frey eletrônico. Foi determinado, a partir desse teste, se a secapina apresenta efeito hiperalgésico ou analgésico. Como controle positivo foi utilizado a carragenina. Para avaliação do efeito inflamatório ou anti-inflamatório da secapina foi utilizado um paquímetro digital Mitutoyo®. Estes testes foram realizados em diversos tempos sendo que o peptídeo foi administrado sempre por via intraplantar.

4.2.3. von Frey Eletrônico

Os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nestas gaiolas 30 minutos antes do início do teste, para adaptação comportamental. Os testes foram realizados apenas quando os animais permaneceram mais serenos, sem movimentos exploratórios ou defecação e sem lamberem seus membros. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica foi mensurada através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1 g e o aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, SP, BRA). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior dos animais, para indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro for retirado. O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem maiores que 1 g. Os animais foram submetidos ao teste von Frey eletrônico em diversos tempos após a administração (tempo zero – antes da injeção da secapina ou carragenina e 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 1440 minutos), por via intraplantar, da secapina ou carragenina (controle positivo).

4.2.4. Edema de Pata

Foi avaliado o possível efeito edematogênico da secapina. Os animais receberam uma aplicação intraplantar (em uma das patas) deste peptídeo, carragenina 1%, ou veículos (controles). O volume da pata foi mensurado nos tempos zero (ante das injeções da secapina ou carragenina), 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 1440 minutos após a injeção do

peptídeo, utilizando um paquímetro digital marca Mitutoyo® (Código 500-196-20B) de especificação 0-150X0,01 mm paquímetro (modelo CD-6''CSX-B, Mitutoyo Sul Americana Ltda).

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$$A (\%) = (V_f - V_i) \times 100 / V_i$$

Onde: A (%) = aumento percentual do volume da pata;

V_i = volume inicial da pata;

V_f = volume da pata após a injeção da secapina, carragenina ou veículos (controle).

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com veículo) dos valores testes (animais injetados com a secapina).

4.2.5. Tratamentos Farmacológicos

Foram utilizadas as seguintes substâncias para a caracterização de alguns dos mecanismos envolvidos nos efeitos hiperalgésicos e edematogênicos da secapina:

- **Indometacina:** 100 µg/25 µL, i.p.l., inibidor da via ciclooxigenase; administrado duas horas e trinta minutos antes da realização da medida final (CHACUR et al., 2003).

- **Zileuton:** 100 mg/kg, por via oral, em 500 µL, inibidor da via lipoxigenase; administrado três horas antes da realização da medida final (HORIZOE et al., 1998).

- **Zafirlukast:** 5 mg/kg, por via oral, em 300 µL DMSO 0,5%, inibidor específico de leucotrienos; administrado duas horas antes da realização da medida final (JAIN et al., 2001).

4.2.6. Hemólise

Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de camundongos *Swiss* em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%, CaCl₂ 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos para evitar a coagulação. Essa suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina a 315 g por 15 minutos para a lavagem das células. Esse procedimento foi realizado por mais duas vezes, sempre descartando o sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante da última centrifugação, o concentrado de hemácias obtido ao final foi considerado como sendo 100% de células. Em seguida, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) diluindo a suspensão de eritrócitos concentrada com solução salina. Essa suspensão de células a 1% foi utilizada nos ensaios de atividade hemolítica.

O ensaio foi realizado em microplacas onde o primeiro orifício de uma linha recebeu 90 µL da solução salina, enquanto que os seguintes receberam 50 µL. Ao primeiro orifício foi

adicionado 10 μL de solução salina contendo 200 μg do peptídeo secapina, o orifício foi homogeneizado e retirou-se 50 μL , o qual foi adicionado ao orifício seguinte e assim progressivamente caracterizando uma diluição seriada em que cada orifício tem sua concentração em dobro ao orifício seguinte, ao final do processo todos os orifícios deverão conter 50 μL (solução salina + peptídeo). Após esse processo cada orifício recebeu 50 μL da suspensão de células 1%, totalizando 100 μL em cada orifício contém solução salina, e suspensão celular a 0,5%. Para o controle de 0% de hemólise, adicionou-se 50 μL de solução salina e 50 μL de suspensão de eritrócitos e para o controle de 100% de hemólise, adicionou-se 10 μL de solução salina com 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) ao invés de peptídeo.

A microplaca foi incubada a 37°C por 2 horas sob leve agitação. Após esse período, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 315 g. Com o sobrenadante, montou-se uma nova microplaca, para realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (Modelo Biotrak II, AMERSHAM BIOSCIENCE,), com filtro de 540 nm.

4.2.7. Desgranulação de mastócitos

Os ensaios de desgranulação de mastócitos foram realizados utilizando o substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminidina para a enzima β -hexosaminidase, co-localizada nos grânulos de mastócitos juntamente com a histamina, que é liberada pelos mastócitos como marcador da desgranulação, sendo detectado o produto de sua hidrólise a 405 nm.

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução MCM-1 (*mast cell medium*) - 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 4 mM NaH_2PO_4 , 3 mM KH_2PO_4 , 5 mM glucose, 15 M BSA e 1 mM CaCl_2 .
- Solução MCM-2 - 100 mL de solução MCM-1 e 50 μL de Liquemine (Heparina Sódica 5000 UI/0,25 mL ROCHE).
- Solução SH - 0.2 M de citrato trissódico, com pH 4,5 e 0,0034 g de p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminidina.

Os mastócitos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss*, os quais foram anestesiados com cloridrato xilazina 2% e cloridrato cetamina 10% e decapitados para a retirada do sangue. Através de um corte longitudinal no abdômen foi possível expor a cavidade peritoneal e realizar a lavagem da cavidade com 10 mL de solução MCM-2, para a extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O fluido peritoneal foi coletado com auxílio de uma seringa e, armazenado em banho de gelo. Esse procedimento foi realizado por

três vezes. O fluido peritoneal foi centrifugado a 100 g, por 5 minutos a 4°C com o sobrenadante sendo descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL da solução MCM-1. Esse procedimento foi realizado por três vezes. Após a última centrifugação, realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio do corante azul de trypan, o qual indica a presença de células inviáveis (mortas), corando-as diferencialmente das células viáveis (vivas). Ao final da contagem, ajustou-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL. Essa suspensão de células foi utilizada nos ensaios de desgranulação de mastócitos.

O ensaio foi realizado em microplacas onde o primeiro orifício de uma linha recebeu 90 µL da MCM-1, enquanto que os seguintes receberam 50 µL. Ao primeiro orifício foi adicionado 10µL de solução salina contendo 200 µg do peptídeo secapina, o orifício foi homogeneizado e retirou-se 50 µL, o qual foi adicionado ao orifício seguinte e assim progressivamente caracterizando uma diluição seriada em que cada orifício tem sua concentração em dobro ao orifício seguinte, ao final do processo todos os orifícios deverão conter 50µL (solução MCM-1 + peptídeo). Para o controle de 0% de desgranulação, adicionou-se 50 µL de solução MCM-1 e 50 µL de suspensão de mastócitos e para o controle de 100% de desgranulação, adicionou-se 10 µL de solução salina com 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) ao invés de peptídeo.

A microplaca foi incubada a 37°C por 15 minutos para que ocorresse o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Após esse período, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 100 g. Com o sobrenadante, montou-se uma nova microplaca, com cada orifício contendo 50 µL de sobrenadante e 50 µL de solução SH. Essa microplaca foi incubada a 37°C por 6 horas. Após a incubação, 50 µL de cada orifício foi descartado e adicionado 150 µL de solução Tris 0,2 M a cada um deles para a realização das leituras de absorbância em uma leitora de microplacas (Modelo Biotrak II, AMERSHAM BIOSCIENCE,), com filtro de 405 nm.

4.2.8. Quimiotaxia

Os leucócitos polimorfonucleares foram coletados a partir da indução de uma inflamação subcutânea em camundongos *Swiss*. Essa inflamação foi induzida através de uma microcirurgia, introduzindo um aparato esponjoso (1 cm³) esterilizado, na região subcutânea do dorso dos animais. Após quatro dias, foi realizada coleta do fluido rico em leucócitos polimorfonucleares contido nas esponjas, com o auxílio de seringas de 20 mL. Esse fluido foi centrifugado em presença de solução salina [NaCl 0.9% (m/v)], por 3 minutos a 100 g. Esse procedimento foi realizado por três vezes. A contagem dos leucócitos polimorfonucleares foi

realizada em câmara de Neubauer, ajustando a concentração para $2,1 \times 10^5$ células/mL. Essa suspensão de células foi utilizada para a realização dos ensaios de quimiotaxia.

Para o ensaio foi utilizada uma câmara de quimiotaxia (Neuro Probe, USA) (FALK et al., 1980) onde cada um dos orifícios da parte inferior da câmara foi preenchido com as amostras diluídas em 400 μ L de solução salina fisiológica. Uma membrana de policarbonato contendo poros de 10 μ m de diâmetro (Neuro Probe, USA) foi posicionada entre a parte inferior e a parte superior da câmara. Cada orifício da parte superior foi preenchido com 200 μ L da suspensão de leucócitos polimorfonucleares. A câmara foi incubada por 1 hora a 37°C e, após esse período realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio do corante azul de trypan, o qual indica a presença de células inviáveis (mortas), corando-as diferencialmente das células viáveis (vivas). Os resultados foram expressos na forma do número de células que migraram para a parte inferior de cada um dos orifícios da câmara, em função da concentração molar da secapina.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm SEM. Os dados referentes aos tratamentos foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias, seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ($p < 0,05$) (KLEINBAUM et al., 1998).

6. RESULTADOS

O peptídeo secapina foi isolado do veneno de abelhas africanizadas e sequenciado junto ao Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, CEIS/IBRC-UNESP tendo se confirmado a sequência primária previamente descrita por Lui e Vernon (1984): **(Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂)**. Este peptídeo foi sintetizado e utilizado nos estudos de caracterização farmacológica no presente trabalho.

6.1. Hemólise

Uma vez que nada se conhecia sobre o efeito do peptídeo secapina presente no veneno bruto de abelha *Apis mellifera*, foi nosso objetivo determinar se este peptídeo apresentava atividades hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotática. O primeiro parâmetro estudado no presente trabalho foi a hemólise. Este teste foi realizado incubando-se eritrócitos com doze diferentes concentrações do peptídeo (diluições seriadas partindo de 100 µg / 100 µL, onde a diluição seguinte é sempre a metade da diluição anterior). Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) foi utilizado como controle positivo enquanto que solução salina sem a presença da secapina foi utilizado como controle. O teste foi realizado em triplicata onde o gráfico abaixo mostra as médias das leituras de absorbância em comprimento de onda de 540 nm. O resultado mostra que a secapina não apresenta atividade hemolítica (Figura 1).

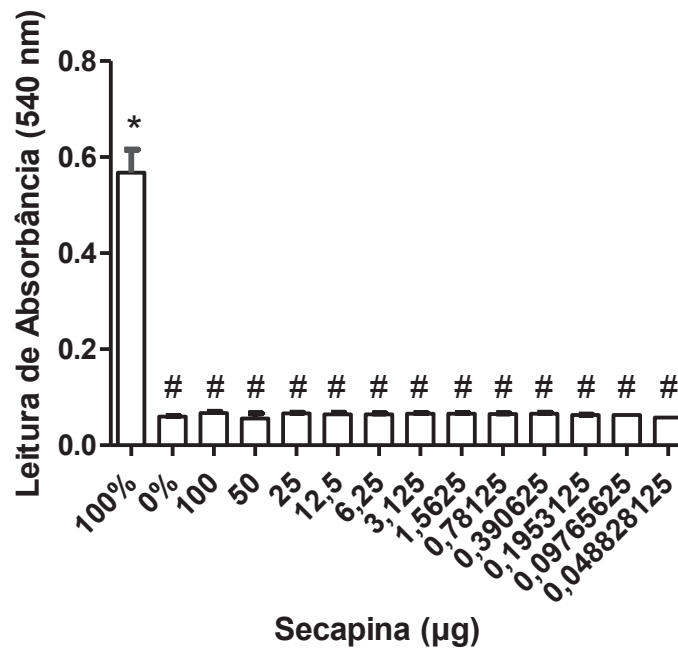


Figura 1 – Atividade hemolítica da secapina. Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de camundongos *Swiss* em 50 mL de solução salina (1% v/v, NaCl 0,85%, CaCl₂ 10 mM). Foram utilizados 12 pontos com diluições seriadas partindo de 100 µg / 100 µL. A atividade hemolítica é representada pela leitura de absorbância em comprimento de onda 540 nm. Os resultados foram expressos como média ±SEM de 3 medidas por grupo. * p<0,001 em relação ao grupo controle (0% – Salina); # p<0,001 em relação ao grupo controle positivo (100% – Triton X-100).

6.2. Desgranulação de Mastócitos

O segundo parâmetro de observação foi detectar se a secapina induzia desgranulação de mastócitos. Este experimento foi realizado utilizando-se 12 diluições seriadas partindo de 100 µg / 100 µL, onde o ponto seguinte é sempre a metade da concentração anterior. Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol) foi utilizado como controle positivo enquanto que solução salina sem a presença da secapina foi utilizado para controle. O teste foi realizado em triplicata onde o gráfico abaixo mostra as médias das leituras de absorvância em comprimento de onda de 405 nm (Figura 2). O resultado mostra que a secapina não apresenta a atividade de desgranulação de mastócitos.

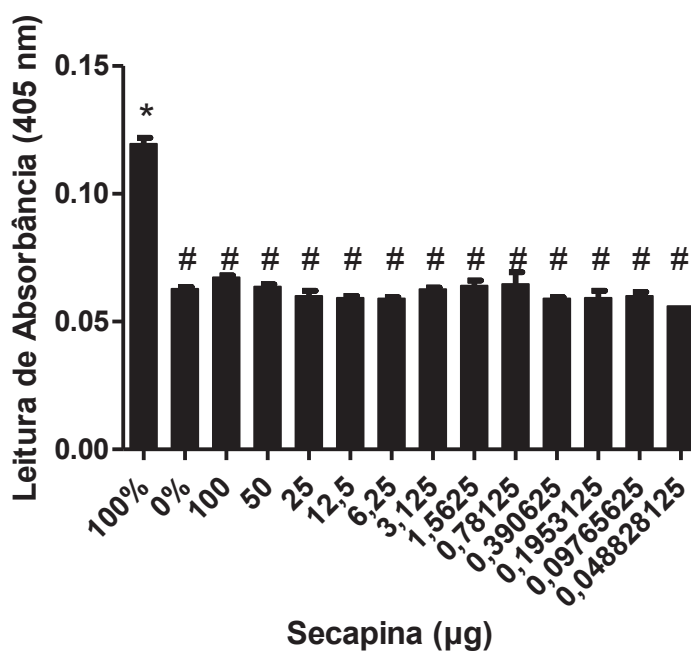


Figura 2 – Atividade desgranuladora de células polimorfonucleadas da secapina. Os mastócitos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss*, através de um corte longitudinal no abdômen. Realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer ajustando-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL. Foram utilizados 12 pontos com diluições seriadas partindo de 100 µg / 100 µL. A atividade desgranuladora é representada pela leitura de absorvância em comprimento de onda 405 nm. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 3 medidas por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (0% - Salina); # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle positivo (100% – Triton X-100).

6.3. Atividade Quimiotática

O terceiro parâmetro estudado foi a atividade quimiotática. Este experimento foi realizado incubando-se leucócitos polimorfonucleares, em presença de seis diferentes concentrações do peptídeo (diluições seriadas partindo de 100 μg / 100 μL , onde o ponto seguinte é sempre a metade da concentração anterior). Solução salina sem a presença do peptídeo foi utilizado para controle. O ensaio foi realizado em triplicata onde a figura abaixo mostra o número de células que migraram para parte superior da membrana devido ação do peptídeo. É possível observar que a secapina não apresentou atividade quimiotática (Figura 3).

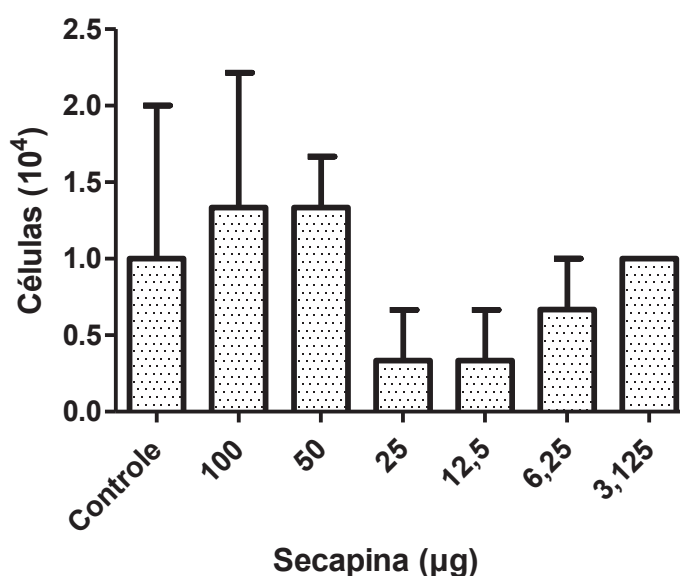


Figura 3 – Atividade quimiotática da secapina. Os leucócitos polimorfonucleares foram coletados a partir da indução de uma inflamação subcutânea em camundongos Swiss. A contagem dos leucócitos polimorfonucleares foi realizada em câmara de Neubauer, ajustando a concentração para $2,1 \times 10^5$ células/mL. Foram utilizados 6 pontos com diluições seriadas partindo de 100 μg / 100 μL . A atividade quimiotática é representada pela quantidade de células (10^4) que migraram da parte superior da membrana para a parte inferior. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 3 medidas por grupo.

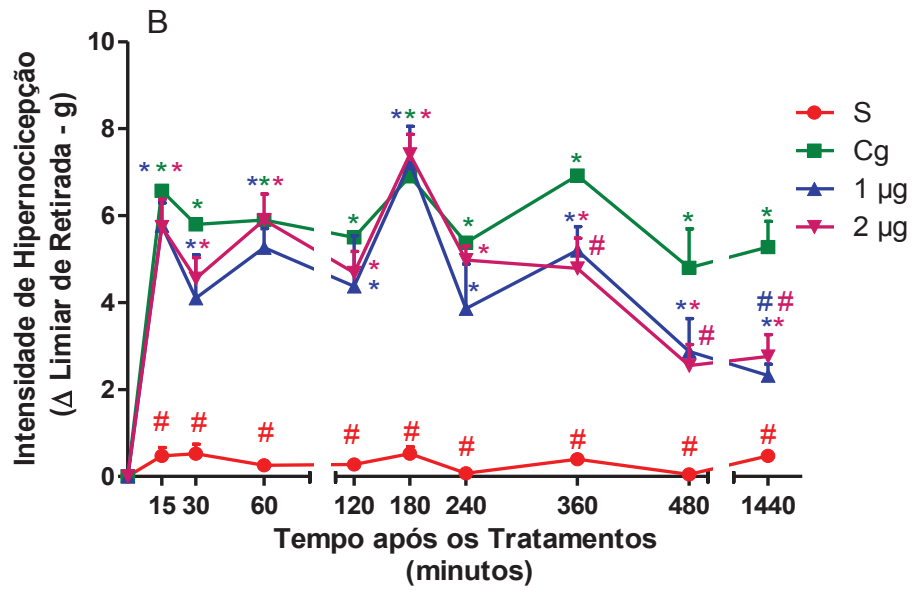
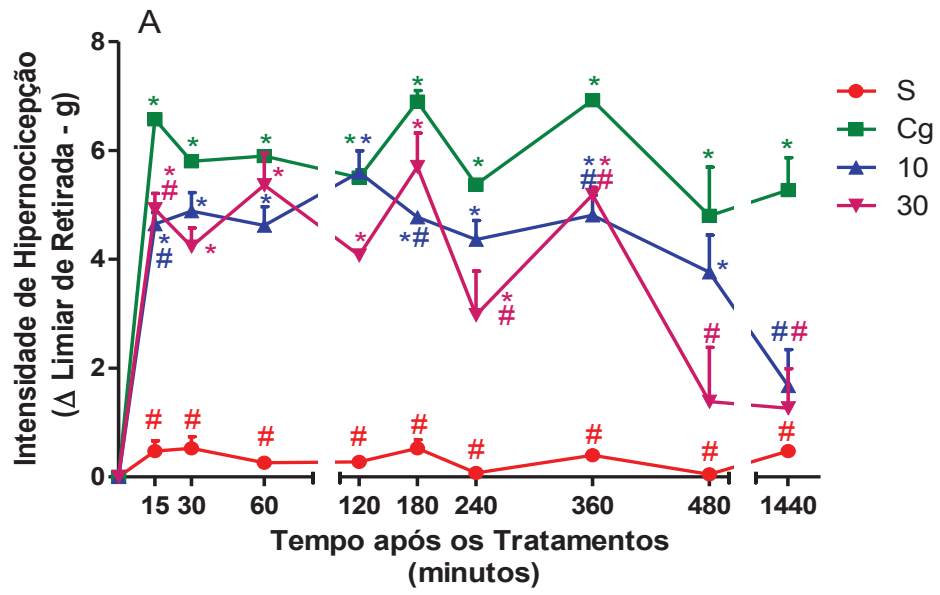
6.4. Atividade Hiperalgésica e Inflamatória

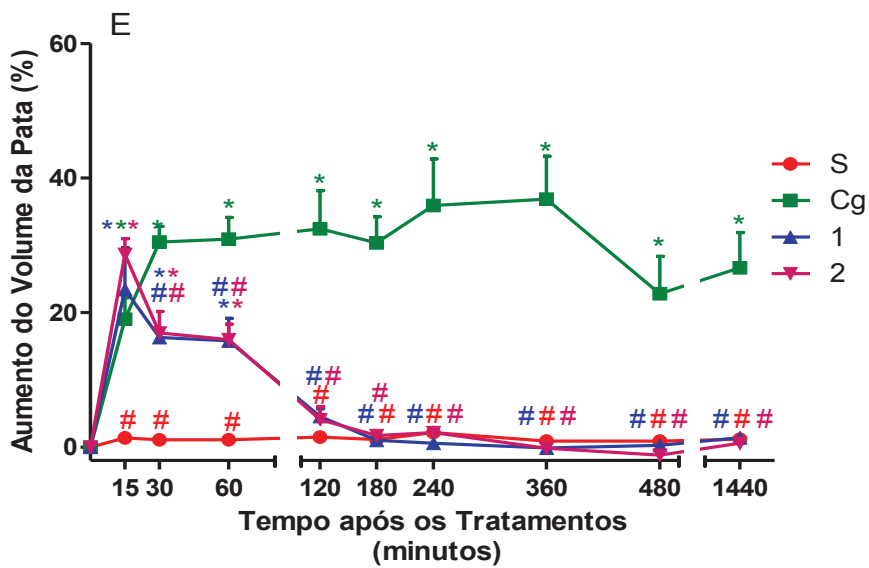
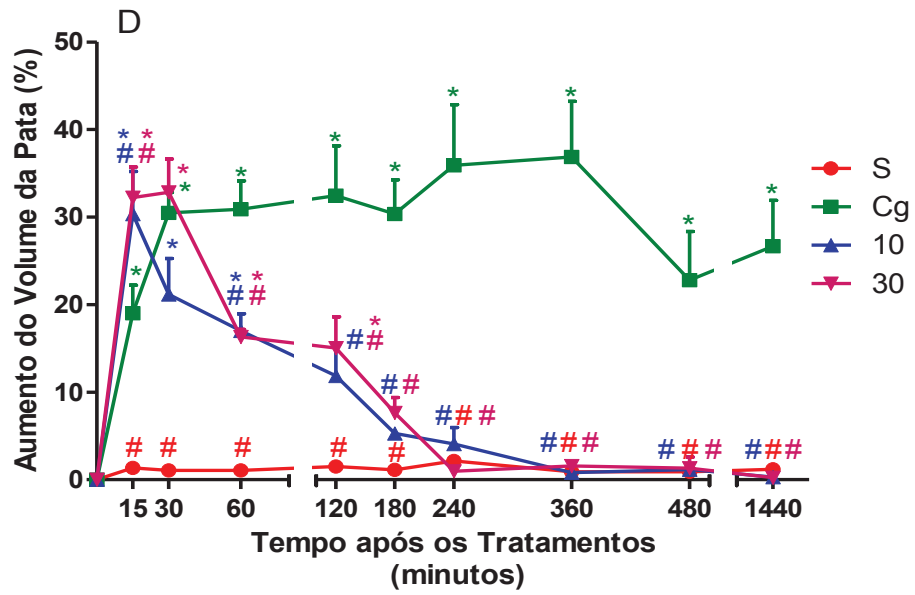
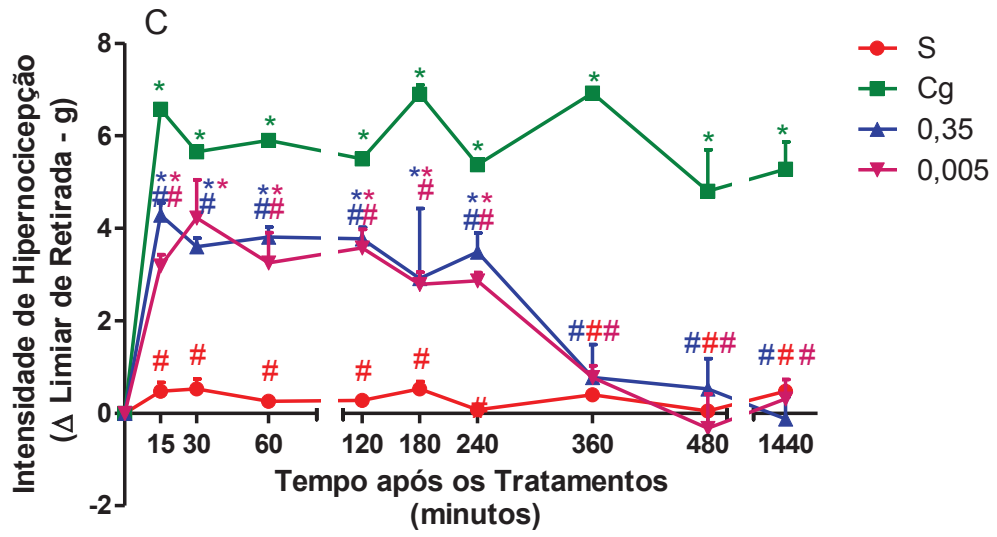
Além das atividades hemolíticas, desgranuladora e quimiotática, foi objetivo do nosso trabalho avaliar se a secapina era capaz de induzir efeito hiperalgésico/analgésico e inflamatório/anti-inflamatório. Desta maneira a secapina (0,005; 0,35; 1; 2; 10 e 30 μg / 50 μL), foi injetado por via intraplantar (i.pl.), nos camundongos, sendo estes avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico) em diversos tempos (15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 1440 minutos) após administração da secapina. Os animais usados no grupo controle foram injetados com o mesmo volume do veículo (salina – S), utilizado na diluição do peptídeo e receberam as mesmas condições experimentais. Já a carragenina (Cg) foi injetada na dose de 300 μg / 50 μL por via i.pl. e representa o grupo controle positivo.

Os resultados mostram que 15 minutos após a injeção da secapina ocorreu um aumento na intensidade de hipernocicepção (hiperalgesia) dos animais em relação à medida inicial (tempo zero – antes da administração da substância) tanto para o peptídeo secapina quanto para o controle positivo Carragenina (Cg). Este aumento caracteriza o fenômeno de hipernocicepção ou hiperlagesia (Figura 4 A, B e C). Porém, esta hiperalgesia persistiu até a medida de 480 minutos (10 e 30 μg – Figura 4 A) e 1440 minutos (1 e 2 μg – Figura 4 B) e não persistiu até a medida de 360 minutos para as doses de 0,005 e 0,35 μg (Fig. 4 C). Os animais tratados com carragenina (controle positivo) apresentaram efeito hiperalgésico por mais que 1440 minutos (Figura 4 A, B e C). Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado (Salina – S – grupo controle – Figura 4 A, B e C).

Além da hiperalgesia, foi avaliada a atividade edematogênica utilizando-se um paquímetro digital. Os resultados mostram que tanto carragenina quanto as doses de secapina (0,005; 0,35; 1; 2; 10 e 30 μg / 50 μL), induziram aumento significativo no volume da pata (em relação ao grupo controle – Salina – S), a partir dos primeiros 15 minutos, resultado este que persistiu significativamente diferente do grupo controle (Salina) até o tempo de 60 minutos do período experimental para as doses de 0,005, 1, 2 e 10 μg e até o tempo de 120 minutos para a dose de 0,35 e 30 μg (Figura 4 D, E e F). Os animais tratados com carragenina (controle positivo) apresentaram efeito edematogênico por mais de 1440 minutos (Figura 4 D, E e F). A salina não apresentou efeito edematogênico durante todo o período experimental.

Nos testes subsequentes para determinação dos mecanismos envolvidos no efeito hiperalgésico e edematogênico da secapina foi utilizada a dose de 0,35 μg / 50 μL por pata.





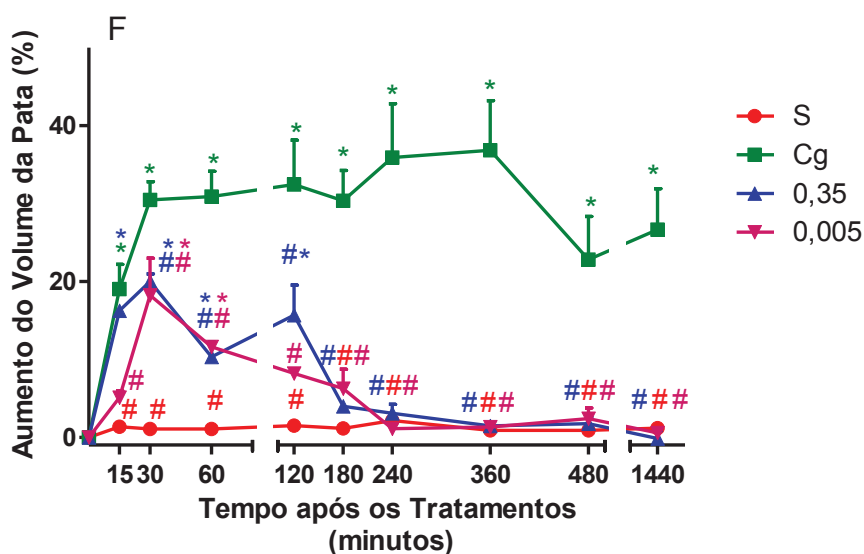


Figura 4 – Efeitos da secapina sobre a hipernociceção e edema. O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A, B e C). O efeito edematogênico foi avaliado através de paquímetro digital (D, E e F). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480 e 1440 minutos após a administração da secapina (0,005; 0,35; (C e F) 1; 2; (B e E) 10 e 30 μg (A e D) / 50 μL i.pl.) ou Carragenina (Cg, 300 μg / 50 μL , i.pl.). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução salina estéril (S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo Salina (S); # $p < 0,001$ em relação ao grupo Carragenina (Cg).

6.5. Tratamentos Farmacológicos

Uma vez que o peptídeo induziu efeito hiperalgésico e edematogênico, nosso próximo objetivo foi avaliar a participação de prostanóides e de mediadores lipídicos, derivados das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, respectivamente, nestes efeitos. Para tanto, todos os camundongos foram injetados com secapina (0,35 μg / 50 μL), e receberam tratamentos com indometacina (Indo, 100 μg / 25 μL , i.pl., inibidor da via ciclooxigenase) ou zileuton (Zil, 100 mg/kg, por via oral, em 500 μL , inibidor da via lipoxigenase) e foram avaliados no teste de hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico) e paquímetro (edema).

Os resultados mostraram que o zileuton causou uma reversão da hiperalgesia induzida pela secapina, em todos os tempos testados, quando comparados com o grupo controle administrado com Salina + Secapina (Sec+S). Por outro lado, a indometacina não reverteu a hiperalgesia, sendo, portanto comparado ao grupo Salina + Secapina (Fig 5 A e C).

Assim como na atividade hipernociceptiva, o zileuton reverteu o efeito edematogênico induzido pela secapina. Porém é observada uma reversão parcial (15 minutos) após administração do peptídeo. A reversão edematogênica é total 1 hora após a

administração da secapina (Figura 5 B e D). Cabe ressaltar que a indometacina não foi significativamente diferente do grupo controle Salina + Secapina, não sendo capaz de reverter o efeito edematogênico.

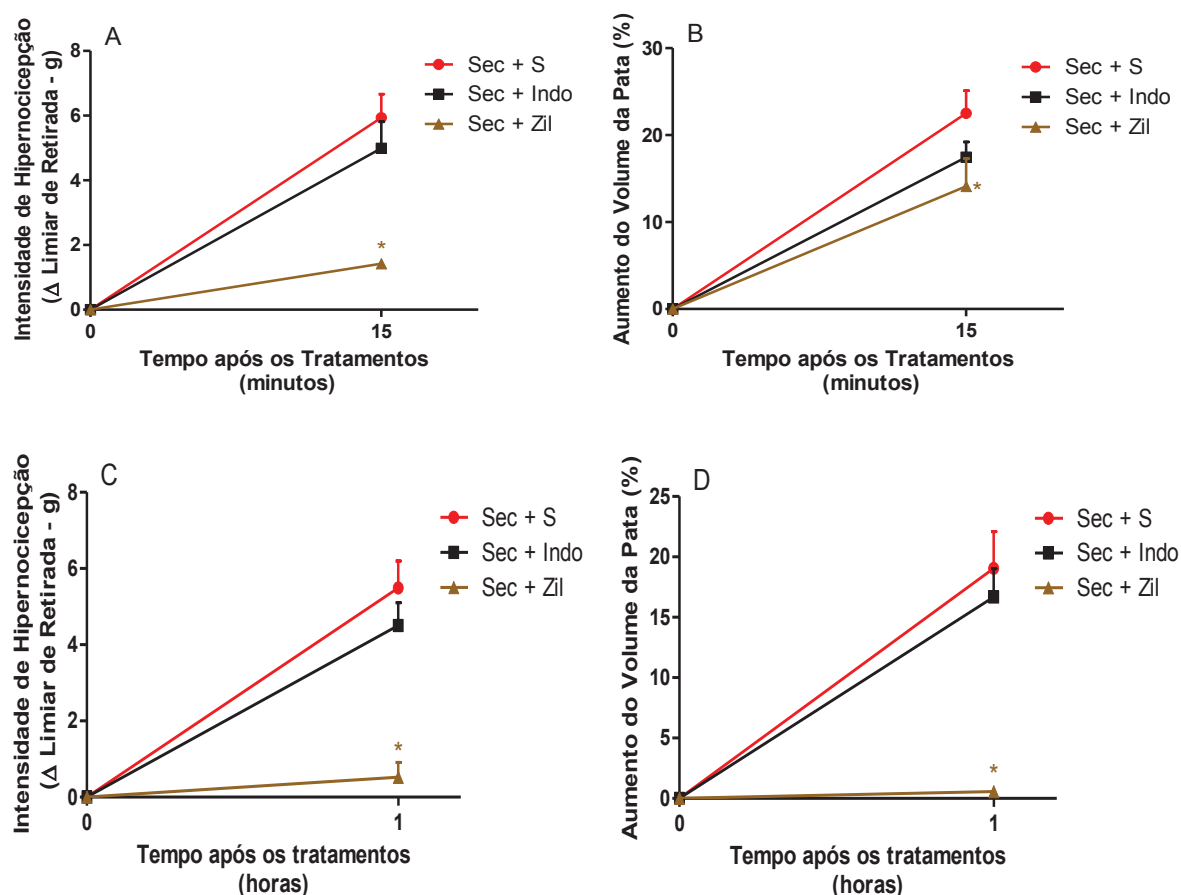


Figura 5 - Efeito do tratamento com Indometacina e Zileuton sobre a sensibilidade dolorosa e edematogênica da secapina. O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A e C) e o efeito edematogênico foi avaliado por paquímetro digital (B e D). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), 15 e 60 minutos após a administração da secapina. A indometacina (Indo, 100 μ g / 25 μ L, i.pl.) e zileuton (Zil, 100 mg/kg, p.o. em 500 μ L) foram administrados 2 horas e 30 minutos e 3 horas antes da medida final, respectivamente. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução secapina + salina (Sec + S). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle Secapina + Salina (Sec + S).

Uma vez que os resultados ora apresentados mostraram reversão da hiperalgesia e edema, tornou-se relevante aprofundar o estudo dos mecanismos de ação induzidos pela secapina. Para isso, injetamos zafirlukast (5 mg/kg, por via oral, 300 μ L em DMSO 0,5% - veículo), um antagonista de receptor de leucotrienos (GREENBERGER, 2009).

Os resultados indicam reversão parcial do zafirlukast sobre o efeito hipernociceptivo induzido pela secapina 15 minutos após sua administração quando comparados ao grupo

controle (Sec + S) (Figura 6 A). O grupo tratado com veículo DMSO 0,5% (Sec + DMSO) não apresentou diferença em relação ao grupo controle (Figura 6 A).

Assim como na atividade nociceptiva, o zafirlukast causou uma reversão parcial na atividade edematogênica 15 minutos após a administração da secapina quando comparado ao grupo controle (Figura 6 B). O grupo tratado com DMSO 0,5% não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 6 B).

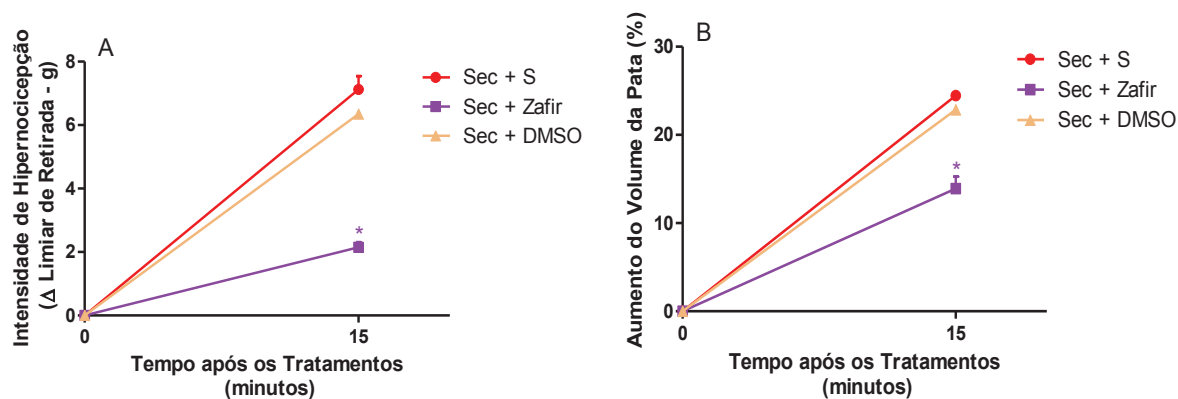


Figura 6 - Efeito do tratamento com Zafirlukast sobre a sensibilidade dolorosa e edematogênica da secapina. O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata (A) e o efeito edematogênico foi avaliado por paquímetro digital (B). As medidas foram realizadas antes (tempo 0) e 15 minutos após a administração da secapina. O zafirlukast (Zafir, 5mg/kg por via oral) antagonista de receptor de leucotrienos, foi administrado 1 hora e 45 minutos antes da administração da secapina. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução secapina + salina (Sec + S) e DMSO 0,5% (secapina + DMSO – Sec + DMSO). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 animais por grupo. * p<0,001 em relação ao grupo controle secapina + salina (Sec + S).

7. DISCUSSÃO

Como mencionado na Introdução, a secapina é um peptídeo policatiônico presente no veneno de abelha *Apis mellifera*, foi encontrada primeiramente por Gauldie et al., (1976), tendo a sua estrutura primária elucidada por Lui e Vernon (1984) (**Y-I-I-D-V-P-P-R-C-P-P-G-S-K-F-I-K-N-R-C-R-V-I-V-P-NH₂**). Resultados obtidos por Matysiak et al., (2011), usando espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e nanoESI-QqTOF corroboram a sequência anunciada anteriormente por Lui e Vernon (1984) e Vlasak (1984), porém estes trabalhos não fazem quaisquer menções aos possíveis efeitos biológicos da secapina.

Os primeiros estudos com peptídeos presentes no veneno de abelha foram realizados por Gauldie et al., (1976). Os autores evidenciaram que este peptídeo não possui atividade tóxica, uma vez que nem administrações de doses elevadas (até 80 mg/kg) da secapina em animais não foram capazes de determinar a dose letal 50% deste peptídeo. Os autores relataram que os animais apresentaram sinais de leve sedação com doses de 40 mg/kg, enquanto que em doses de 80 mg/kg foi evidenciado sinais de sedação após 15 minutos de sua administração, além de piloereção e hipotermia (GAULDIE et al., 1976).

Diferentemente do encontrado para a secapina, há diversos trabalhos mostrando diferentes atividades para o veneno bruto de abelha da espécie *Apis mellifera* e/ou de substâncias isoladas deste veneno (CHEN E LARIVIERE, 2010; SON et al., 2007, para revisão).

Lariviere e Melzack (1996), publicaram os primeiros dados experimentais utilizando veneno bruto de *Apis mellifera* em modelo animal. O experimento consistia em administrar diferentes doses deste veneno por via intraplantar em ratos. Esse trabalho mostrou que a injeção do veneno de abelha na pata traseira dos animais induz sinais de atividade nociceptiva mensurado através de escores, onde 0 indica que o animal não apresentou reação, 1 o animal apresenta elevação da pata sem lambida e no escore 2 o animal lambe, morde e bate a pata repetidas vezes. As doses utilizadas nesse trabalho foram de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 mg por pata de veneno bruto de abelha. Lariviere e Melzack (1996), ainda mostraram que a atividade nociceptiva observada foi dose dependente. Também foi demonstrado que o comportamento de nocicepção apresentado pelos animais durou até uma hora após a injeção do veneno em todas as doses. Apenas a dose mais alta de 0,3 mg de veneno bruto teve efeito nociceptivo por mais de uma hora.

Chen et al., (1999), também relataram um efeito hiperalgésico causado pelo veneno de abelha quando injetados na pata traseira de ratos. Os autores mostraram também que tal efeito pode ser diferente de acordo com o estímulo nocivo usado. Estímulo mecânico

(filamentos de von Frey), causa uma queda de 48% no limiar nociceptivo do animal, enquanto que estímulo térmico causa uma queda de 42% deste limiar. Também foi demonstrado que por estímulos mecânicos, o efeito hiperalgésico ocorre apenas periféricamente enquanto que em estímulos térmicos o efeito hiperalgésico ocorre também na pata contralateral do animal, mostrando um efeito central deste veneno. Outro fator importante mostrado pelos autores é o efeito prolongado do fenômeno hiperalgésico, uma vez que a dose de 0,2 mg apresentou efeito de até 72 horas.

Brigatte et al., (2011), estudou efeito hiperalgésico e edematogênico da melitina, sendo este peptídeo o mais abundante e mais importante do veneno bruto de abelha, utilizando o modelo de estímulo mecânico (von Frey eletrônico) em camundongos. O autor injetou por via intraplantar, doses de 10, 30 e 50 μg e foram realizadas medidas de 2, 4, 8 e 24 horas após a administração da melitina. O efeito hiperalgésico apresentado pela melitina persistiu por mais de 8 horas após a administração do peptídeo em todas as doses. Já o efeito edematogênico persistiu por mais de 8 horas apenas nas doses de 30 e 50 μg mostrando o efeito prolongado desta substância.

Uma vez que Brigatte et al., (2011), utilizaram o modelo do von Frey eletrônico e as doses de 10 e 30 μg , o presente trabalho optou por iniciar os testes com estas doses. Uma vez que não houve diferença significativa apresentado no presente trabalho entre as doses de 10 e 30 μg / 50 μL por pata, foi necessário diminuir as doses utilizadas. Nesta diminuição, foi considerada a dose de 0,35 μg que corresponde a 0,5% de secapina presente no veneno bruto de abelha, uma vez que em uma ferroada há a liberação de 70 μg deste veneno na vítima (SCHUMACHER et al., 1994 Lui e Vernon, 1984). A mesma correlação foi utilizada para a dose de 0,005 e 1 μg de secapina (Lariviere et al., 2005).

A dose efetiva da secapina foi a de 0,35 μg , já que a mesma é a dose mais baixa e que produz o efeito hiperalgésico e edematogênico significativamente diferente dos animais controles. Portanto, esta foi a dose escolhida para os ensaios subsequentes.

Além disso, foi estudada neste trabalho a duração do efeito hiperalgésico e edematogênico. O efeito hiperalgésico persistiu por até 24 horas para as doses de 1 e 2 μg . Para as doses de 10 e 30 μg , o efeito durou 8 e 6 horas respectivamente, assemelhando-se com os resultados obtidos por Brigatte et al., (2011) no estudo da melitina. Já para as doses de 0,005 e 0,35 μg o efeito nociceptivo persistiu até a 4ª hora após a administração da secapina.

O efeito edematogênico foi significativamente diferente do grupo controle persistindo por até 2 horas para as doses de 0,005, 1, 2 e 10 μg e por até 3 horas para as doses de 0,35 e 30 μg . Estes dados diferem dos encontrado por Brigatte et al., (2011), onde o efeito

edematogênico induzido pela administração de melitina manteve-se significativamente diferente do grupo controle por até 4 horas para a dose de 10 µg e por mais de 8 horas para as doses de 30 e 50 µg. Uma vez que a melitina é o principal componente do veneno, este dado pode explicar os resultados encontrados.

Ainda, Lariviere et al., (1996), relatam que o efeito edematogênico do veneno bruto pode persistir por 4 horas para dose de 10µg, 24 horas para doses de 50 µg e por 48 horas para a dose de 100 µg.

O presente trabalho mostrou efeito edematogênico de curta duração causado pela secapina. Este resultado pode estar relacionado ao fato dos ensaios para hemólise, desgranulação de mastócitos e quimiotaxia terem sido negativos, demonstrando baixa toxicidade celular e potencial edematogênico desta substância.

Uma vez que a secapina apresentou efeito hiperalgésico e edematogênico, o próximo passo foi avaliar os mediadores químicos envolvidos nestes fenômenos. Para tanto os animais foram tratados com Indometacina e Zileuton (antagonistas inespecíficos da via das ciclooxigenase e lipoxigenase, respectivamente).

A via das ciclooxigenases resulta na formação de prostaglandinas (PGE₂) e tromboxanas (TXA₂). As duas principais isoformas, COX-1 (ácido graxo ciclooxigenase-enzima constitutiva) e COX-2 (frequentemente induzida por estímulos inflamatórios), transformam ácido araquidônico em PGE₂ e TXA₂. Os produtos finais bioativos formados pela catalisação destas enzimas são PGE₂, PGI₂ (prostaciclina), PGD₂, PGF_{2α} e TXA₂ (RANG E DALE, 2007).

As prostaglandinas (PGs) intensificam o efeito de dor de maneira indireta através da atuação de outros agentes, tais como, 5-hidroxitriptamina ou a bradicinina. As PGs das séries E e F são liberadas na inflamação e também durante a isquemia tecidual. Sensibilizam as terminações nervosas a outros agentes, em parte por inibição dos canais de potássio e, em parte, por facilitação, através de reações de fosforilação do segundo mensageiro, dos canais de cátions abertos por agentes nociceptivos. Os efeitos analgésicos dos anti-inflamatórios não esteroidais decorrem da inibição da síntese de prostaglandinas (RANG E DALE, 2007).

A via das lipoxigenase resulta na formação de leucotrienos, incluindo leucotrieno B₄ (LTB₄), o ácido eicosatetranóico 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z e os leucotrienos cisteinil (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e a ativação de quatro receptores para leucotrienos, tais como, BLT₁, BLT₂, cisLT₁ e cisLT₂. Os leucotrienos são produzidos por múltiplas células inflamatórias, particularmente por mastócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (BERGER et al., 2007). O zileuton, inibidor da via da 5-lipoxigenase (5-LO), é o único medicamento

encontrado comercialmente (BERGER et al., 2007). Alguns produtos da ciclooxigenase podem se apresentar aumentados pelo efeito dos produtos da síntese da via das 5-LO em outras células e tecidos ou como resultado dos efeitos fisiológicos dos leucotrienos nos músculos das vias aéreas. Nestas circunstâncias, a inibição da via das 5-LO pode ocasionar diminuição nos produtos da via das ciclooxigenase (KANE et al., 1995). O leucotrieno B₄ sensibiliza nociceptores, induzindo o fenômeno de hiperalgesia o qual não é totalmente revertido por drogas anti-inflamatórias não esteroidais (RACKHAM E FORD-HUTCHINSON, 1983; LEVINE et al., 1993; LEVINE et al., 1984; MARTIN, 1990; MARTIN et al., 1988; MADISON et al., 1992) (Figura 7).

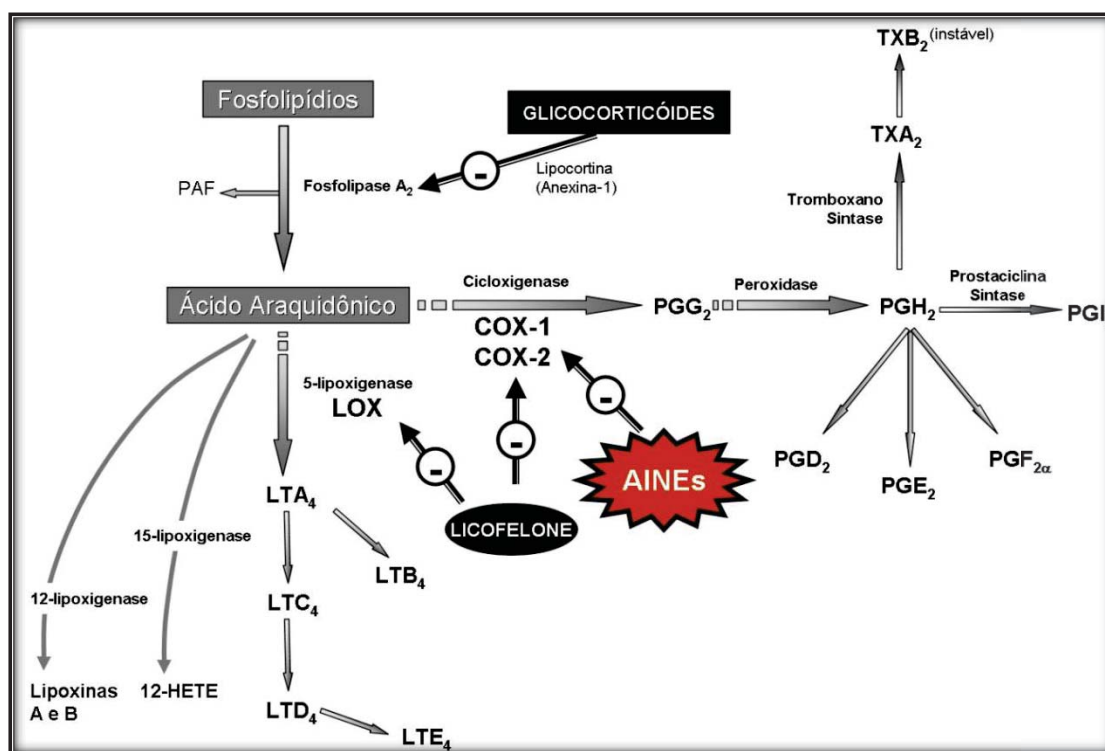


Figura 7 – Biossíntese dos Eicosanóides. Fosfolipídeos da membrana plasmática são metabolizados pela fosfolipase A₂ a ácido araquidônico, precursor comum de todos os eicosanóides (prostanóides e leucotrienos). O ácido araquidônico é metabolizado por duas vias principais: via ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e via lipoxigenase (LOX). Pela via da COX são produzidos os prostanóides: prostaglandinas (PG) E₂, D₂, F₂, e prostaciclina (PGI₂) além de tromboxano (TXA₂ e TXB₂). Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a atividade enzimática da COX prevenindo a formação de prostanóides. Drogas como licofelone inibem COX e LOX, prevenindo a síntese de prostanóides e leucotrienos. Glicocorticóides, através da indução da produção de lipocortina ou anexina-1, inibem a fosfolipase A₂ impedindo a síntese de todos os eicosanóides (RIBEIRO et al., 2009).

Nossos resultados mostram uma reversão parcial dos efeitos hiperalgésicos e edematogênicos para os animais tratados com zileuton em 15 minutos após a injeção da secapina, e reversão total em 60 minutos após a injeção do peptídeo. Animais tratados com indometacina não obtiveram diferença significativa para com o grupo controle. Esta reversão total do zileuton observada em 60 minutos (sendo que o pico de ação da secapina é em 15 minutos), após a administração da secapina pode ser explicada devido ao efeito edematogênico desta substância, após 1 hora, ser menor do que após 15 minutos da administração da secapina.

Assim como para secapina, Brigatte et al., (2011) evidenciou a participação de mediadores lipídicos nos fenômenos hiperalgésicos e edematogênicos induzidos pela melitina. Por outro lado, Lariviere et al., (2005), demonstraram que para o veneno bruto de abelha, os prostanóides medeiam a dor e a inflamação observadas uma vez que o anti-inflamatório indometacina reverte esses efeitos. Estes dados corroboram aos encontrados por Mourelle et al., (2011, em preparação), mostrando que os prostanóides medeiam o efeito hiperalgésicos e edematogênicos do veneno bruto de *Apis mellifera*. Uma vez que o veneno é um pool de substâncias, não se conhece, até o momento, a interação entre todas as substâncias presentes neste veneno que pudesse explicar estes dados.

Uma vez o que zileuton, inibidor da síntese de leucotrienos (inibidor da enzima 5-lipoxigenase), reverteu a hiperalgesia e o edema induzidos pela secapina, foi utilizado zafirlukast (antagonista de receptores de leucotrienos). Assim como o zileuton, o zafirlukast reverteu parcialmente os fenômenos observados pela secapina, mostrando que receptores de leucotrienos medeiam estes fenômenos.

Estes dados, analisados em conjunto, demonstram que os mediadores lipídicos são mais importantes no processo hiperalgésico e edematogênico observados, particularmente, para a secapina.

8. CONCLUSÃO

É de suma importância a investigação dos produtos naturais, tais como o veneno de animais e seus componentes, uma vez que com o avanço tecnológico, novas metodologias são desenvolvidas proporcionando resultados mais eficazes que podem contribuir para a terapêutica.

O presente trabalho é pioneiro no estudo de atividade biológica do peptídeo secapina, onde é necessário que novas pesquisas nesse sentido sejam desenvolvidas.

Em conclusão, a secapina não induz atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos e quimiotático. Ainda, a secapina induziu efeito hiperalgésico e edematogênico mediado, particularmente por leucotrienos.

Estes resultados sugerem, finalmente, que a secapina contribui com a inflamação e dor induzido pelo veneno de abelha *Apis mellífera*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNILA, I. Bee venom allergy. **Clinical And Experimental Allergy**, Tampere, v.30, p.1682-1687, 2000.

BANKS, B.E.C., SHIPOLINI, R.A. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom, in **Venoms of the Hymenoptera- biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. Edited by Tom Piek, London, Academic Press, 1986. p.569

BERGER, W; DE CHANDT, M.T.; CAIRNS, C.B. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. **Int J Clin Pract**, v.61, p.663-676, 2007.

BERNSTEIN, I.L.; LI, J.T.; BERNSTEIN, D.I.; HAMILTON, R.; SPECTOR, S.L.; TAN, R.; SICHERER, S.; GOLDEN, D.B.; KHAN, D.A.; NICKLAS, R.A.; PORTNOY, J.M.; BLESSING-MOORE, J.; COX, L.; LANG, D.M.; OPPENHEIMER, J.; RANDOLPH, C.C.; SCHULLER, D.E.; TILLES, S.A.; WALLACE, D.V.; LEVETIN, E.; WEBER, R. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. **Ann Allergy Asthma Immunol**, Ohio, v.100, p.1-148, 2008.

BIDARD, J.N.; MOURRE, C.; GANDOLFO, G.; SCHWEITZ, H.; WIDMANN, C.; GOTTESMANN, C.; LAZDUNSKI, M. Analogies and differences in the mode of action and properties of binding sites (localization and mutual interactions) of two K⁺ channel toxins, MCD peptide and dendrotoxin I. **Brain Research**, Nice, v.495, p.45-57, 1989.

BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. MCD-peptide from bee venom: isolation, biochemical and pharmacological properties. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, Berlin, v.261, p.257-270, 1968.

BRIGANTI, L.E.R.P.P.L.D.B. **Estrutura e Função de Peptídeos Policatiônicos de *Apis mellifera***. 2010. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

BRIGATTE, P.; CURY, Y.; DE SOUZA, B.M.; BAPTISTA-SAIDEMBERG, N.B.; SAIDEMBERG, D.M.; GUTIERREZ, V.P.; PALMA, M.S. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*). **Amino Acids**, v.40, p.101-111, 2011.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J.L.; TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v.41, p.667-678, 2003.

CHANG, Y.H.; BLIVEN, M.L. Anti-arthritic effect of bee venom. **Agents Actions**, v.9, p.205-211, 1979.

CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. In: BARRAVIERA, B. (Org). Venenos animais – Uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, p. 14-18, 1994.

CHEN, J.; LARIVIERE, W.R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in neurobiology**, v.92 p.151-183, 2010.

CHEN, J.; LUO, C.; LI, H.L.; CHEN, H.S. Primary hyperalgesia to mechanical and heat stimuli following subcutaneous bee venom injection into the plantar surface of hindpaw in the conscious rat: a comparative study with the formalin test. *Pain*, v.83, p.67-76, 1999.

CHEN, Y.N.; LI, K.C.; LI, Z.; SHANG, G.W.; LIU, D.N.; LU, Z.M.; ZHANG, J.W.; JI, Y.H.; GAO, G.D.; CHEN, J. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. **Neuroscience**, v.138, p.631-640, 2006.

CUENDE, E.; FRAGUAS, J.; PENA, J.E.; PENA, F.; GARCIA, J.C.; GONZALEZ, M. Beekeeper' arthropathy. **The Journal of rheumatology**, Toronto, v.26, p.2684-2690, 1999.

EISEMAN, J.L.; von BREDOW, J.; ALVARES, A.P. Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. **Biochemical pharmacology**, v.6, p.1139-1146, 1982.

EISNER, T.; WILSON, E. O. The insects: Readings from Scientific American. San Francisco. **Freeman**, p. 3-15, 1997.

FREDHOLM, B. Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom. **Biochemical pharmacology**, v.15, p.2037-2043, 1966.

GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; RUMJANEK, F. D. ; SHIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. The Peptide Components of Bee Venom. **European journal of biochemistry**, v. 61, p.369-376, 1976

GAULDIE, J.; HANSON, J.M.; SHIPOLINI, R.A.; VERNON, C.A. The structures of some peptides from bee venom. **European journal of pain**, London, v.83, p.405-410, 1978.

GOLDEN, D.B. Epidemiology of allergy to insect venoms and stings. **Allergy proceedings: the official journal of regional and state allergy societies**, Baltimore, v.10, p 103-107, 1989.

GOULET, H. & HUBER, J.T. Hymenoptera of the world: a guide to identification of families. **Agriculture Canada**, 1993.

GREENBERGER, P.A. **Asthma** In: PATTERSON, R.; GRAMMER, L.C.; GREENBERGER, P.A. Allergic Diseases: Diagnosis & Management. 7ª Edição Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2009. Cap. 19.

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

HABERMANN, E. Studies on the inhibition of blood coagulation by bee venom. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.223 p.182-197, 1954.

HABERMANN, E; REIZ, K.G. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. **Biochemische Zeitschrift**, v.343, p.192-203, 1965.

HANSON, P.E. & GAULD, I.D. **The biology of hymenoptera. Natural history**, In: HANSON, P.E. & GAULD, I.D. (Eds.). *The Hymenoptera of Costa Rica*, New York, Oxford University Press, 1995, p.20-28.

HIDER, R.C.; RAGNARSSON, U. A comparative structural study of apamin and related bee venom peptides. **Biochimica et biophysica acta**, v.667, p.197-208, 1981.

HONG, Y.; ABBOTT, F.V. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. **Neuroscience**, v.63, p.827-836, 1994.

HORIZOE, T.; NAGAKURA, N.; CHIBA, K.; SHIROTA, H.; SHINODA, M.; KOBAYASHI, N.; NUMATA, H.; OKAMOTO, Y.; KOBAYASHI, S. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. **Inflammation research**, v.47, p375-383, 1998.

HUGUES, M.; ROMEY, G; DUVAL, D; VINCENT, J.P.; LAZDUNSKI, M. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79 p.1308-1312, 1982.

IDE, T.; TAGUCHI, T.; MORITA, T.; SATO, M.; IKENAKA, K.; AIMOTO, S.; KONDO, T.; HOJO, H.; KASAI, M.; MIKOSHIBA, K. Mast cell degranulating peptide forms voltage gated and cation-selective channels in lipid bilayers. **Biochemical and biophysical research communications**, v.163, p.155-160, 1989.

JAIN, N.K.; KULKARNI, S.K.; SINGH, A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. **European journal of pharmacology**, v.423, p.85-92, 2001.

JASANI, B.; KREIL, G.; MACKLER, B.F.; STANWORTH, D.R. Further studies on the structural requirements for polypeptide-mediated histamine release from rat mast cells. **The Biochemical journal**, v.181, p.623-632, 1979.

KANE, G.C.; TOLLINO, M.; POLLICE, M.; KIM, C.J.; COHN, J.; MURRAY, J.J.; DWORSKI, R.; SHELLER, J.; FISH, J.E.; PETERS, S.P. Insights into IgE-mediated lung inflammation derived from a study employing a 5-lipoxygenase inhibitor. **Prostaglandins**, v.50, p.1-18, 1995.

KAY, A.B.; LESSOF, M.H. Allergy. Conventional and alternative concepts. A report of the Royal College of Physicians Committee on Clinical Immunology and Allergy. Clinical and experimental allergy. **Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v.22, p.1-44, 1992.

KLEINBAUM D.G.; KUPPER, L.L.; MULLER, K.E.; NIZAM, A. Analysis of repeated measures data in Brooks/Cole Publishing Company (eds): *Applied Regression Analysis and*

Other Multivariable Methods. **Brooks/Cole Publishing Company**, New York, p.589–638, 1998.

KOBUROVA, K.L.; MICHAILOVA, S.G.; SHKENDEROV, S.V. Further investigation on the anti-inflammatory properties of adolapin – bee venom polypeptide. **Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica**, v.11, p.50-55, 1985.

KOBUROVA, K.L.; MICHAILOVA, S.G.; SHKENDEROV, SV. Antipyretic effect of a polypeptide from bee venom – adolapin. **Eksperimentalna meditsina i morfologija**, v.23, p.143-148, 1984.

KOUMANOV, K.; MOMCHILOVA, A.; WOLF, C. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type II secretory phospholipase A2. **Cell biology international**, v.27, p.871-877, 2003.

KOYAMA, N.; HIRATA, K.; HORI, K.; DAN, K.; YOKOTA, T. Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin. **Pain**, v.84, p.133-139, 2000.

KUDELIN, A. B.; MARTINOV, V.I. ; KUDELINA, I. A.; MIROSHNIKOV, A. I. Abstr. 15th. Meet. Eur. Pept. Symp, p.84, 1979.

KWON, Y.B.; LEE, J.D.; LEE, H.J.; HAN, H.J.; MAR, W.C.; KANG, S.K.; BEITZ, A.J.; LEE, J.H. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. **Pain**, v.90, p.271-280, 2001.

LARIVIERE, W.R.; CHESLER, E.J.; Zhen, L.; Gang-Wei, S.; Ya-Ning, C.; Yao-Qing, Y.; Zhuo-Min, L.; Ying, C.; Ceng, L.; Kai-Cheng, L.; Jun, C. Correlations between edema and the immediate and prolonged painful consequences of inflammation: therapeutic implications? **Acta Physiologica Sinica**, v.57, p.278-288, 2005.

LARIVIERE, W.R.; MELZACK, R. The bee venom test: a new tonic-pain test. **Pain**, v.66, p.271-277, 1996.

LAZDUNSKI, M.; FOSSET, M.; HUGHES, M.; MOURRE, C.; ROMEY, G.; SCHMID-ANTOMARCHI, H. The apamin-sensitive Ca^{2+} -dependent K^{+} channel molecular properties, differentiation and endogenous ligands in mammalian brain. **Biochemical Society symposium**, v.50, p.31-42, 1985.

LEE, J.D.; PARK, H.J.; CHAE, Y.; LIM, S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v.2, p.79-84, 2005.

LEE, M.S.; PITTLER, M.H.; SHIN, B.C.; KONG, J.C.; ERNST, E. Bee venom acupuncture for musculoskeletal pain: a review. **The journal of pain: official journal of the American Pain Society**, v.9, p.289-297, 2008.

LEVINE, J.D.; LAU, W.; KWIAT, G.; GOETZL, E.J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v.225, p.743-745, 1984.

LEVINE, J.D.; FIELD, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, v.13, p.2273-2286, 1993.

LIU, S.; YU, M.; HE, Y.; XIAO, L.; WANG, F.; SONG, C.; SUN, S.; LING, C.; XU, Z.; Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac 1-dependent pathway. **Hepatology**, v.47, p.1964-1973, 2008^b.

LIU, S.I.; CHENG, H.H.; HUANG, C.J.; CHANG, H.C.; CHEN, I.S.; HSU, S.S.; CHANG, H.T.; HUANG, J.K.; CHEN, J.S.; LU, Y.C.; JAN, C.R. Melittin-induced $[Ca^{2+}]$ increases and subsequent death in canine renal tubular cells. **Human & experimental toxicology**, v.27, p.417-424, 2008^a.

LOWY, P.H.; SARMIENTO, L.; MITCHELL, H.K. Polypeptides minimize and melittin from bee venom: effects on Drosophila. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.145, p.338-343, 1971.

LUI, L.K.; VERNON, C.A. The structure of secapin: a peptide from bee venom. **Journal of chemical research**, p10-11. 1984.

MADISON, S.; WHITSEL, E.A.; SUAREZ-ROCA, H.; MAIXNER, W. Sensitizing effects of leukotriene B4 on intradental primary afferents. **Pain**, v.49, p.99-104, 1992.

MALASPINA, O.; BUENO, O.C.; AUGUSTO, A.V.L.; PALMA, M.S. **Biologia dos himenópteros sociais**. In: CASTRO, F.F.M.; PALMA, M.S. Alergia a venenos de insetos. 1^a Edição. Barueri: Editora Malone Ltda., 2009. Cap.2, p.5-36.

MARTIN, H.A. Leukotriene B4 induced decrease in mechanical and thermal thresholds of C-fiber mechanonociceptors in rat hairy skin. **Brain Res**, v.509, p.273-279, 1990.

MARTIN, H.A.; BASBAUM, A.I.; GOETZL, E.J. LEVINE, J.D. Leukotriene B4 decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. **J Neurophysiol**, v.60, p.438-445, 1988.

MATYSIAK, J.; SCHMELZER, C.E.; NEUBERT, R.H.; KOKOT, Z.J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.54, p.273-278, 2011.

MCCORMIC, K.D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.10, p. 2411-2451, 1993.

MEINWALD, J.; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance (Colloquium paper). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p.14-18, 1995.

MIROSHNIKOV, A.I.; BOIKOV, V.A. SNEZHKOVA, L.G; SEVERIN, S.E; SHVETS, V.I. Interaction of tertiapin, a neurotoxina from bee venom, with calmodulin. **Bioorganicheskaja khimiia**, v.9, p.26-32, 1983.

MOURELLE, D.; BRIGATTE, P.; BRIGANTI, L.E.R.P.P.L.D.B.; PALMA, M.S. Involvement of prostanóides, the most important mediator, in hyperalgesic and edematogenic effects of honeybee *Apis mellifera* venm. 2011. Em preparação.

NEUMANN, W.; HABERMANN, E. Characterization of the substances of the bee venom. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.222, p.267-287, 1954.

ORSOLIC, N.; SVER, L.; VERSTOVSEK, S.; TERZIC, S.; BASIC, I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. **Toxicon**, v.41, p.861-870, 2003.

PIEK, T. Venoms of the hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioural aspects. **Academic Press**, London, 1986. 569p.

RACKHAM, A.; FORD-HUTCHINSON, A.W. (1983) Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D4, B4 and prostaglandin E1 in the rat paw. **Prostaglandins**, v.25, p.193-203, 1983.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6^o edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro/RJ. 2007.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M. L.; DE SOUSA, M.H.L.P. **Antiinflatórios não-hormonais e COXIBEs**. In: NETO, O.A. Dor - Princípios e prática. 1^a Edição. Editora Artmed. 2009, Cap. 88.

ROH, D.H.; KWON, Y.B.; KIM, H.W.; HAM, T.W.; YOON, S.Y.; KANG, S.Y.; HAN, H.J.; LEE, H.J.; BEITZ, A.J.; LEE, J.H. Acupoint stimulation with diluted bee venom (apicupuncture) alleviates thermal hyperalgesia in a rodent neuropathic pain model: involvement of spinal alpha 2-adrenoceptors. **The journal of pain: official journal of the American Pain Society**, v.5, p.297-303, 2004.

SCHUMACHER, M.J.; TVETEN, M.S.; EGEN, N.B. Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.93, p.831-835, 1994.

SHARMA, S.V. Melittin-induced hyperactivation of phospholipase A₂ activity and calcium influx in ras-transformed cells. **Oncogene**, v.8, p.939-947, 1993.

SHKENDEROV, S.; KOBUROVA, K. Adolapin – a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. **Toxicon**, v.20, p.317-321, 1982.

SIMONS, F.E.; FREW, A.J.; ANSOTEGUI, I.J.; BOCHNER, B.S.; GOLDEN, D.B.; FINKELMAN, F.D.; LEUNG, D.Y.; LOTVALL, J.; MARONE, G.; METCALFE, D.D.; MULLER, U.; ROSENWASSER, L.J.; SAMPSON, H.A.; SCHWARTZ, L.B.; van HAGE, M.; WALLS, A.F. Practical allergy (PRACTALL) report: risk assessment in anaphylaxis. **Allergy**, v.63, p.35-37, 2008.

SON, D.J.; LEE, J.W.; LEE, Y.H.; SONG, H.S.; LEE, C.K.; HONG, J.T.; Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & therapeutics**, v.115, p.246-270, 2007.

SPOERRI, P.E.; JENTSCH, J.; GLESS, P. Apamin from bee venom: effects of the neurotoxin on cultures of the embryonic mouse cortex. **Neurobiology**, v.3, p.207-214, 1973.

SPOERRI, P.E.; JENTSCH, J.; GLESS, P. Apamin from bee venom: effects of the neurotoxin on subcellular particles of neural cultures. **FEBS letters**, v.53, p.143-147, 1975.

SUMIKURA, H.; ANDERSEN, O.K.; DREWES, A.M.; ARENDT-NIELSEN, L. Secondary heat hyperalgesia induced by melittin in humans. **European journal of pain**, v.10, p.121-125, 2006.

SUN, G.Y.; XU, J.; JENSEN, M.D.; SIMONYI, A.; Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of lipid research**, v.45, p.205-213, 2004.

TALBOT, J.C.; BERNARD, E.; MAUREL, J.P.; FAUCON, J.F.; DUFOURCQ, J. Melittin-phospholipid interactions: binding of the mono- and tetrameric form of this peptide, and perturbations of the thermotropic properties of bilayers. **Toxicon**, v.20, p.199-202, 1982.

VICK, J.A.; SHIPMAN, W.H. Jr; BROOKS, R. Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardiopep, a newly isolated substance from whole bee venom. **Toxicon**, v.12, p.139-144, 1974.

WON, C.H.; CHOI, E.S.; HONG, S.S. Efficacy of bee venom injection for osteoarthritis patients. **The journal of the Korean Rheumatism Association**, v.6, p.218-226, 1999.

XU, X.; NELSON, J.W. Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry. **Proteins**, v.17, p.124-137, 1993.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

Danilo Mourelle
Aluno

Prof. Dr. Mario Sergio Palma
Orientador

Patrícia Brigatte
Co-Orientador