

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA
RESPOSTA CUTÂNEA LOCAL INDUZIDAS
POR DOSES DILUÍDAS DE VENENO DE
ABELHA EM CÃES

ANNE MARIE YASUI

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA (CIÊNCIAS
CLÍNICAS)

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DA RESPOSTA
CUTÂNEA LOCAL INDUZIDAS POR DOSES DILUÍDAS
DO VENENO DE ABELHA EM CÃES

ANNE MARIE YASUI

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
MAGDA ALVES DE MEDEIROS

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre** no Curso de Pós-
Graduação em Medicina
Veterinária (Ciências Clínicas)

Seropédica, RJ
JULHO de 2012

Anexo C –Ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central

658.32

B333r

Orientador:

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(Ciências Clínicas)

ANNE MARIE YASUI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Clínicas**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/07/2012

Dra. Magda Alves de Medeiros Prof Associada I-Dept Ciências Fisiológicas-UFRJ
(Orientadora)

Dra Márcia Valéria Rizzo Sconamillo Szabó- Pesquisadora Autônoma

Dra Maria das Graças Danelli-Profª Associada II-UFRJ

Dr Wellington Côrtes –Prof Associado I- Depto de Ciências Fisiológicas-UFRJ

Dedico

Aos cães que pacientemente contribuíram para este trabalho, e a todos os animais aos quais dedico minha vida buscando aprender um pouquinho mais a cada dia para ser uma veterinária um pouquinho melhor sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por tudo que tenho recebido em minha vida inclusive este trabalho.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental e Pesquisa Veterinária e toda equipe do Professor Fábio Scott pelo enorme apoio no desenvolvimento deste trabalho. Vocês são cientistas e seres humanos incríveis!

A minha família por todo apoio durante os momentos difíceis. A meus Pais pelo amor e compreensão que tenho recebido em toda minha vida. Meu irmão “Cientista Peixólogo” George Yasui de volta ao Brasil, e minha irmã “Dra Dentista Especial” Erika Yasui por todo incentivo desde os primeiros momentos desta jornada. Meu irmão Ralph Yasui, pelo exemplo de integridade, fé e persistência.

A minha orientadora Magda Alves de Medeiros por toda confiança e incentivo nesses anos de trabalho em equipe.

A toda “equipe Mega evento” pela amizade, dedicação, e responsabilidade, cada um à sua maneira: Marcelo, o estagiário “Mega evento”, André Peixoto, o “estagiário do termômetro”, Marlon, o “estagiário do algodão e do papel”, André Savino, o “estagiário da piada”. Vocês e todos os nossos “Mega eventos Acupunturísticos” certamente são uma parte muito especial da minha vida.

A amiga recém chegada Laura Morena, por todo apoio e paciência nos momentos de “emoção” dos dias de experimento.

A todos os colegas e amigos que apoiaram este trabalho.

RESUMO

YASUI, ANNE MARIE. Avaliação da toxicidade e da hipersensibilidade induzida por doses diluídas de veneno de abelha em cães. 2012. 44p. Dissertação (Mestrado em Veterinária Clínica e Cirurgia). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O veneno de abelhas (BV, do inglês beevenom), vem sendo usado com propósitos terapêuticos tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária. A apipuntura é uma prática terapêutica da acupuntura, onde o veneno de abelhas é injetado em pontos de acupuntura, através do próprio ferrão do inseto na pele ou de aplicação de injeções de veneno diluído. Apesar dos efeitos promissores do BV, o potencial tóxico do veneno de abelhas deve ser considerado. O objetivo deste estudo foi monitorar os possíveis efeitos tóxicos e a resposta cutânea local induzida pela injeção de doses diluídas em cães Beagles saudáveis. A resposta cutânea local foi mensurada através da distensão tecidual relativa onde a distensão da orelha esquerda, injetada com 0,1 ml de uma solução de BV diluído em salina nas doses de 0,3mg/kg (n=4), 0,043mg/kg (n=4) de BV/animal ou de salina (grupo controle, n=4) foi comparada com a distensão da orelha direita injetada com salina. A distensão tecidual relativa foi analisada nos tempos 5, 10, 15, 30 minutos, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós inoculação do veneno. As alterações clínicas como frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial e temperatura; assim como as reações comportamentais; os perfis hematológico (hemograma) e renal (uréia, creatinina) e foram monitorados em diferentes tempos após a inoculação. O pico de distensão tecidual relativa ocorreu 6 horas após a inoculação do veneno, sendo a dose de 0,3mg/kg capaz de produzir distensão diferente do controle-salina nos tempos 1, 6 e 12 horas após inoculação. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos nos demais parâmetros analisados. Estes resultados indicam que o veneno de abelhas em cães produz um pico de reação cutânea local 6 horas após a inoculação e que as doses de 0,3mg/kg e 0,043mg/kg não produzem alterações comportamentais ou autonômicas significativas além de não produzir nefrotoxicidade ou alterações no perfil hematológico de cães.

Palavras chave: veneno de abelha, apipuntura, cães, toxicidade, reação cutânea local

ABSTRACT

YASUI, ANNE MARIE. 2012. Assessment of toxicity and hypersensitivity induced by diluted doses of bee venom in dogs. 2012. 44p Dissertation (Master in Veterinary Sciences – Institute of Veterinary, Department of Clinic and Surgery, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The bee venom (BV) has been used for therapeutic purposes in both human medicine and veterinary medicine. The apipuncture is a therapeutic practice of acupuncture, where the bee venom is injected into acupuncture points, by their own insect's sting into the skin or injections of diluted venom. Despite the promising effects of BV, the toxic and allergenic potential of bee venom should be considered. The aim of this study was to check the possible toxic effects and local cutaneous reaction of the injection of diluted doses in healthy dogs Beagles. The local cutaneous reaction was measured by relative tissue distension on where the distension of the left ear (injected with 0.1 ml of a solution BV diluted with saline in the doses of 0.3 mg / kg (n = 4), 0.043 mg / kg (n= 4) BV / animal or saline (control group, n = 4) was compared with the distension of the right ear, injected with saline. The tissue distension was analyzed on the times of 5, 10, 15, 30 minutes, 1, 6, 12, 24, 48 and 72 hours post inoculation. Clinical changes such as heart rate and respiratory rate, blood pressure and temperature as well as behavioral responses, the profiles hematologic (blood) and kidney (urea, creatinine and urinalysis) were monitored at different times after inoculation. The peak of tissue distension occurred 6 hours after venom inoculation and the dose of 0.3 mg/kg produced significant higher distension than the saline-control group one, 6 and 12 hours after inoculation. No significant differences were found between groups for the other parameters. These results indicate that the bee venom in dogs produced a peak of cutaneous distension 6 hours after inoculation and that the dosis of 0.3 mg / kg and 0.043 mg / kg did not produced significant behavioral or autonomic changes and did not produced nephrotoxicity or hematological changes in dogs.

Keywords:bee venom, apipuncture, dogs, toxicity and cutaneous local reaction

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Componentes do BV e suas maiores características.

Tabela2. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha na temperatura corporal de cães.

Tabela3. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha na Pressão arterial de cães

Tabela4. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha na Frequência cardíaca de cães.

Tabela 5. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha na Frequência respiratória de cães.

Tabela 6. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha nos parâmetros hematológicos da Série Vermelha de cães.

Tabela7. Influência de doses diluídas de Veneno de abelha nos parâmetros hematológicos da Série Branca de cães.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Abelha (*Apis mellifera*).

Figura 2: Preparo do local de inoculação.

Figura 3: Método de mensuração da distensão tecidual.

Figura 4: Avaliação da reação cutânea local à doses diluídas de veneno de abelhas (BV).

Figura 5: Análise dos níveis de uréia (A) e creatinina (B) após injeção de doses diluídas de veneno de abelhas (BV).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. JUSTIFICATIVA.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	4
Geral.....	4
Específico.....	4
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1. O veneno de Abelhas.....	5
2.2. A Apipuntura.....	7
2.3. Efeitos tóxicos do Veneno de Abelhas.....	9
2.4. Avaliação da Resposta cutânea local a substâncias irritantes.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
Animais.....	14
Desenho Experimental.....	14
Grupos.....	14
Análise da reação tecidual local.....	15
Avaliação das respostas clínicas.....	16
Avaliação da pressão arterial.....	16
Gradação das Possíveis reações analifáticas.....	16
Tratamento das possíveis respostas de anafilaxia.....	17
Avaliação Hematológica e bioquímica do sangue.....	17
Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS.....	18
Reação cutânea local.....	18
Análise comportamental.....	18
Reações anafiláticas.....	19
Temperatura Corporal.....	19
Pressão Arterial.....	20
Frequência Cardíaca.....	20
Frequência Respiratória.....	21
Avaliação Hematológica e bioquímica do sangue.....	21
SERIE VERMELHA.....	21
SERIE BRANCA.....	22
Ureia e Creatinina.....	24

5. DISCUSSÃO	26
Doses diluídas de Veneno de abelha promovem reação cutânea local com o pico de 6h.....	26
Doses diluídas de Veneno de abelha não promove alterações clínicas e comportamentais	26
Doses diluídas de Veneno de abelha não promove alterações hematológicas.....	26
Doses diluídas de Veneno de abelha não produz nefrotoxicidade.....	27
Segurança de Doses diluídas de Veneno de abelha em cães.....	27
Recomendações no uso da apipuntura em cães	27
6. CONCLUSÕES	29
7. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

Além de efeitos tóxicos, os componentes bioativos de muitos venenos de origem animal apresentam alto valor farmacológico. O veneno de abelha (BV, do inglês *bee venom*) possui aproximadamente 18 componentes ativos, entre eles enzimas, bioaminas e peptídeos com importantes efeitos biológicos. As propriedades curativas do BV tem uma tradição muito longa. No Egito antigo muitas doenças foram tratadas com unguento feito de veneno abelhas. Hipócrates empregou picadas de abelhas nele próprio, além de Galen (130 d.C) e Charlemagne terem recebido tratamento semelhante em articulações com artrite. Likomskiy (1864) e Tere (1888) publicaram os primeiros estudos clínicos a respeito da influência de picadura de abelha no reumatismo (BECK, 1997). Por isso, ao longo dos tempos o veneno de abelha tem sido utilizado com propósitos terapêuticos tanto em medicina como em medicina veterinária.

A apipuntura é uma prática terapêutica em que veneno de abelha é injetado em pontos de acupuntura com o propósito de potencializar o efeito da acupuntura e do BV. A injeção do veneno pode ser realizada através da aplicação do ferrão da própria abelha na pele ou de solução diluída de veneno. De acordo a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), a apipuntura reúne conceitos da acupuntura e da farmacopéia chinesa que além das ervas, inclui vegetais, minerais e partes de animais no tratamento de doenças. Na farmacopéia Chinesa apesar de muito utilizado tradicionalmente nos países orientais em diversas patologias, a classificação e as indicações do BV não é descrita nesta literatura clássica. No entanto, em tratamentos alternativos e nos estudos experimentais a apipuntura tem se mostrado muito promissora no tratamento de diversas doenças como a artrite, reumatismo, dor nas costas, tumores malignos e doenças de pele. De maneira geral, os efeitos da apipuntura podem estar relacionados a combinação de dois mecanismos terapêuticos distintos: o primeiro é o efeito sistêmico do próprio BV no organismo e o segundo é o efeito local do BV na estimulação de pontos de acupuntura.

A acupuntura é uma das terapias da MTC que tem como técnica básica à inserção de agulhas finas de metal em pontos específicos da pele com propósitos terapêuticos. A injeção de substâncias nos pontos é uma variação da acupuntura e tem o objetivo de promover uma estimulação mais duradoura e intensa dos pontos potencializar os efeitos da substância injetada e conseqüentemente produzir melhores resultados terapêuticos. Neste sentido, de acordo com a Medicina Chinesa, o uso de substâncias nos pontos de acupuntura potencializa o efeito do procedimento. Estudos mostraram que a injeção de sub-doses de fármacos em pontos de acupuntura teve a mesma eficácia que a dose convencional na indução de luteólise e na redução da concentração plasmática de progesterona em éguas

A eficácia da apipuntura tem sido avaliada tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos em humanos. Os estudos experimentais apresentam evidências claras a respeito do efeito antiinflamatório, analgésico e anti-artrite do BV. No entanto estudos clínicos apesar de também indicarem efeitos positivos, estes efeitos precisam ser validados por estudos com maior número de pacientes e desenho experimental mais adequado. Ainda assim o potencial terapêutico do BV é enorme.

Em humanos, a apiterapia é uma técnica relativamente segura se praticada por profissionais capacitados. A preocupação inicial é com o desenvolvimento de reações alérgicas já que a dose de veneno injetada não é considerada suficiente para induzir efeitos tóxicos. Desta forma, antes de iniciar a terapia, é realizado um teste para verificar se o paciente é alérgico ao veneno. Este teste consiste na aplicação de uma pequena quantidade do veneno na pele do paciente e a verificação da reação local e dos níveis para IgE específica de veneno de abelha. Somente pacientes com reação cutânea normal e níveis de IgE baixos

podem receber o tratamento. Além disso, a Associação Americana de Apiterapia aconselha que em toda sessão de apiterapia esteja disponível epinefrina, corticosteróides e anti-histamínicos para situações de reação anafilática.

Em cães submetidos a apipuntura, a preocupação quanto ao desenvolvimento de alergia é a mesma que em humanos. Além do teste cutâneo antes do início da apiterapia, há também a precaução de ter sempre disponíveis medicamentos para possíveis reações anafiláticas. No entanto, apesar de ser utilizada em diversos países, até este momento não foram encontrados artigos científicos de circulação ocidental sobre potencial tóxico ou da eficácia da apipuntura em cães. Desta forma, o presente estudo se propõe a monitorar os possíveis efeitos tóxicos e a reação cutânea local a diferentes diluições do veneno de abelha em cães para que no futuro possamos testar de uma forma segura a eficácia clínica da apipuntura.

1.1. JUSTIFICATIVA

O potencial terapêutico da apipuntura (injeção de veneno de abelha em pontos de acupuntura) é muito promissor tanto para humanos como para animais. No entanto antes de ser avaliada a eficácia clínica desta terapia, deve se avaliar seus riscos, uma vez que o veneno de abelha pode causar anafilaxia e intoxicação em casos de envenenamento severo. Desta forma propomos o estudo dos possíveis efeitos tóxicos e reação cutânea local da injeção de veneno de abelha em diferentes diluições, comumente utilizadas na prática de apipuntura (variando entre 100 a 1500 vezes menor que a dose letal) para que no futuro possamos propor um protocolo seguro do uso da apiterapia em cães.

1.2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos e areação cutânea local da injeção de veneno de abelha em diferentes diluições em cães visando um protocolo seguro para a apipuntura.

Específico

Avaliar os efeitos tóxicos da aplicação única intradérmica de diferentes diluições de veneno de abelha em cães saudáveis através da análise das respostas clínicas, hematológicas e bioquímicas.

Avaliar a reação cutânea local induzida pela aplicação única intradérmica de diferentes diluições de veneno de abelhas através da análise da distensão tecidual provocada pela injeção do veneno.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O veneno de Abelhas

A abelha melífera, espécie *Apis mellífera*, pertence a ordem Hymenóptera, classe Insecta. As abelhas são animais sociais, de hábitos herbívoros, alimentam-se de néctar e pólen e possuem a capacidade de inocular seu veneno utilizando o aparelho ovipositor modificado no final de seu abdômen. No momento da inoculação do veneno, a abelha melífera introduz o seu ferrão juntamente com o saco de veneno na pele da vítima. O conjunto ferrão mais saco de veneno é desconectado de seu abdômen e a abelha morre logo após a picada (FITZGERALD e FLOOD, 2006).



Figura 1: Fotografia da Abelha (*Apis mellifera*).

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f5/Apis_mellifera_carnica_worker_hive_entrance_2.jpg

2.1.1. Efeitos terapêuticos e mecanismos de ação do veneno de abelha e de seus componentes

O BV contém pelo menos 18 componentes ativos, incluindo enzimas, peptídeos e aminas biogênicas que possuem uma vasta variedade de propriedades farmacêuticas (VICK e SHIPMAN, 1972). Estudos da década de 70, mostraram que o BV pode estimular o sistema imune e aumentar a produção de cortisol (VICK e SHIPMAN, 1972). Neste caso, as propriedades anti-artrites e anti-reumatismo do BV seriam decorrentes da estimulação da liberação de cortisol pelas adrenais o que levaria a um efeito anti-inflamatório. Estudos mais recentes demonstraram diversos efeitos anti-artrites e anti-inflamatório do BV e/ou de seus componentes. A diminuição da expressão da ciclo-oxigenase (COX)-2 e da fosfolipase-A2 e a diminuição dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL)-1, IL-6, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio tem sido associadas aos efeitos anti-artrite da melitina (um dos componentes mais importantes do BV) (MURAKAMI et al., 1997; PELLETIER et al., 1998; AMIN et al., 1999; CERNANEC et al., 2002). Adolapina também apresentou atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pato induzido pela carragenina, prostaglandina e adjuvante de Freund e no modelo da

poliartrite induzida por adjuvante de Freund (PELLETIER et al., 1998). Os efeitos da adolapina são provavelmente devidos a sua habilidade de inibir a síntese de prostaglandinas através do bloqueio da COX (SHKENDEROVA e KOBUROVA, 1982; KOBUROVA et al., 1985). Apamina, um bloqueador do canal de K^+ ativado pela condutância de Ca^{+2} , significativamente inibe a contração traqueal induzida pela ovalumina e a liberação de histamina pelo tecido pulmonar, sugerindo que este componente reduz a inflamação alérgica das vias aéreas através do efeito de estabilização dos mastócitos (ICHINOSE et al., 1995). Mais recentemente foi demonstrado que a melitina inibe a atividade do NF- κ B, um fator de transcrição crítico que regula a expressão de genes inflamatórios, pela inibição da fosforilação de I κ B (PARK et al., 2004; PARK et al., 2007).

Em concordância com o uso clínico do BV para alívio da dor aguda e crônica, alguns estudos demonstraram efeito anti-nociceptivo do BV em modelos de dor induzida por estímulo térmico, na dor visceral e inflamatória. O mecanismo de ação inicialmente sugerido a “facilitação” da transmissão nervosa e a “cura” de várias desordens neurológicas pela ação de várias bioaminas constituintes do BV, como apamina, histamina, procaína, serotonina e noradrenalina. O que daria ao BV a habilidade de percorrer axônios da medula espinhal e chegar até as áreas lesadas e assim ajudar na recuperação de lesão de nervos e conseqüentemente restaurar o movimento (BANKS et al., 1979; SHUBA e VLADIMIROVA, 1980). Evidentemente esta hipótese precisa ser melhor investigada.

Várias evidências apontam que BV também apresenta atividade anti-câncer. Venenos provenientes de vários animais peçonhentos têm apresentado a propriedade de matar células tumorais (para revisão ver SON et al., 2007). O principal mecanismo envolvido na atividade anti-câncer do BV é a atividade citotóxica da melitina pela ativação da PLA_2 . O que levaria a indução da apoptose nas células tumorais através da ativação de caspases e metaloproteases (HOLLE et al., 2003; MOON et al., 2006). Neste caso a melitina pode agir em diversos tipos de células tumorais como no câncer de rim, pulmão, fígado, próstata, bexiga, mama, como também na leucemia. A ligação da melitina a receptores hormonais assim como a terapia gênica carreando a melitina pode ser útil como um novo tratamento para alguns tipos de câncer, como o de próstata e o de mama (LI et al., 2006; RUSSELL et al., 2004; HU et al., 2006b, a). A indústria farmacêutica tem extensivamente investido na pesquisa de potenciais venenos como a nova geração de drogas anti-câncer.

Tabela1. Componentes do BV e suas maiores características.

Componentes	% BV	Características conhecidas
Peptídeos		
Melitina	40-50	26 aminoácidos, aumenta a atividade da PLA ₂ ,efeitos citotóxicos sobre células cancerígenas,efeitosantiinflamatórios e antiartrite.
Apamina	2-3	10 aminoácidos, inibição do Ca ⁺⁺ e ativação do canal de K ⁺ , efeitos citotóxicos sobre câncer, efeitos nociceptivos, propriedades antiinflamatórias.
Peptídeos MCD	2-3	22 aminoácidos, propriedades antiinflamatórias e analgésicas, liberação de histamina (em baixas doses) e inibição da liberação de histamina (altas doses), efeito antialérgico.
Adolapina	1	Inibição da da PLA ₂ e da atividade da COX, atividade antiinflamatória e efeito analgésico
Inibidor de Proteases	<0,8	
Minimina	2-3	
Procamina A, B	1,4	
Secarpina	0,5	
Tertiapina	0,1	
Melitina F	0,01	
Cardiopep	<0,7	
Enzimas		
PLA ₂	10-12	Efeitos citotóxicos sobre células cancerígenas, efeitos inflamatórios, e antitumor.
Hialuronidase	1,5-2	Ataque tecidual seletivo ao polímero ácido hialurônico, aumento da permeabilidade capilar, reposta imunológica e difusão tedidual, efeito antigênico.
Glucosidase	06	
Ácido Fosfomonoesterase		
Aminas		
Histaminas	1,5	
Dopamina	0,13-1	
Norepinefrina	0,1-0,7	
Outros		
Carbohidratos	1,5	
Ácido γ aminobutírico	0,13-1	
Norepinefrina	0,1-0,7	

Traduzido de Son e colaboradores, 2007.

2.2. A Apipuntura

Apiterapia ou terapia com veneno de abelha é a aplicação terapêutica do veneno de abelha para o tratamento de diversas doenças. A apiterapia tem sido usada como medicina tradicional para o tratamento de diversas condições, como artrites, reumatismo, dor nas costas, tumores malignos, e doenças de pele(HIDER, 1988).

A acupuntura é a terapiada Medicina Tradicional Chinesa maisutilizada no mundo. O termo original chinês Zhenjiu -a agulha e moxa- nos dá referência que diferentes técnicas de estimulação podem ser utilizadas(DRAEHMPAEHL, 1994). A manipulação mecânica ou elétrica ou oestímulo térmico com ervas,potencializam o efeito da introdução de agulhas nos pontos de acupuntura e são bastante difundidos mesmo no mundo Ocidental. Inúmeras pesquisas relatam o valor terapêutico de cada uma destas técnicas de estimulação.

A injeção de fármacos em pontos de acupuntura é uma técnica bastante simples e muito utilizada em medicina veterinária. A praticidade está principalmente no pequeno tempo de contenção requisitado do animal. São administrados volumes pequenos de medicamentos, em pequenos animais em torno de 0,1 a 0,2ml em pontos regulares de acupuntura, pontos dolorosos ao toque e pontos gatilho, utilizando seringas e agulhas comuns na prática clinica(SHOEN, 2006).

Mais recentemente, com os avanços da biologia molecular, a apipuntura, antes confinada a terapia tradicional, tem alcançado o meio científico devido ao conhecimento da composição e do potencial farmacológico do BV. Semelhante as outras técnicas de estimulação, o objetivo da apipuntura é aumentar a eficiência dos pontos de acupuntura e do próprio medicamento (KIM e KANG 2010). Desta forma pode-se manter o estímulo por um tempo prolongado, e minimizar os efeitos tóxicos do BV já que na apipuntura são geralmente administradas doses baixas de veneno. Nenhum dos artigos sobre apipuntura que encontramos demonstrou efeitos tóxicos do tratamento. Em revisão sistemática a respeito das técnicas de farmacopuntura, reunindo artigos publicados desde Fevereiro de 1997 a Dezembro de 2009, Kim e Kang em 2010, avaliam o material medicinal, pontos de acupuntura utilizados e a doença tratada. Ao avaliar o material medicinal mais utilizado na farmacopuntura, o veneno de abelha é o mais frequente nos estudos incluídos (42%). A maior parte dos efeitos indesejáveis encontrado com a farmacopuntura está relacionado ao processamento inadequado do produto injetado nos casos de soluções fitoterápicas como refino e esterilização inapropriados para uso injetável (KOO et al., 2010).

2.2.1. Estudos experimentais sobre os efeitos da aplicação de BV em pontos de acupuntura

A apipuntura, aplicação do BV em pontos de acupuntura, parece aumentar a eficácia do BV. O uso vem aumentando principalmente em países orientais, e muitos estudos tem demonstrado seu efeito anti-inflamatório (para revisão: SON et al., 2007). A principal hipótese é que a apipuntura intensifica os efeitos do próprio BV o que auxilia ainda mais na melhora clínica. A especificidade do efeito do sítio de aplicação foi verificada através de estudos comparativos onde a estimulação com BV de pontos de acupuntura foi comparada com a estimulação de não-pontos em modelos animais de artrite (KWON et al., 2001d; KWON et al., 2002; KIM et al., 2003).

A injeção direta de BV no acuponto 36E no modelo animal de artrite crônica produz um potente efeito anti-nociceptivo quando comparada a estimulação de não-pontos. Alguns estudos têm demonstrado que a estimulação de pontos de acupuntura de regiões inespecíficas produz efeitos antinociceptivos. Apipuntura no ponto VC12 reduziu a dor visceral no modelo das contorções pelo ácido acético (KWON et al., 2001a; KWON et al., 2005). A apipuntura também apresentou efeitos antinociceptivos nos modelos de hiperalgesia mecânica e térmica (KWON et al., 2001d; LEE et al., 2001); da formalina (KIM et al., 2003; BAEK et al., 2006; ROH et al., 2006), da artrite induzida pelo colágeno (BAEK et al., 2006) assim como na dor relacionada a osteoartrite de joelho (KWON et al., 2001b).

Múltiplos mecanismos têm sido implicados nos efeitos da apipuntura como a ativação de receptores opióides e α 2-adrenérgicos e a ativação das vias descendentes serotoninérgicas (KWON et al., 2001d; KWON et al., 2005; BAEK et al., 2006).

2.2.2. Estudos clínicos sobre eficácia da apipuntura

A eficácia da apiterapia foi avaliada por diversos estudos clínicos, no entanto revisões recentes apontam que apesar de existirem evidências sobre o efeito positivo do BV no tratamento de doenças, muito ainda precisa ser feito nesta área. Lee e colaboradores efetuaram uma revisão sistemática de vários artigos sobre o efeito apipuntura no tratamento da dor musculoesquelética e concluíram que existem evidências da efetividade da apipuntura no tratamento da dor musculoesquelética. No entanto, o número total de artigos científicos incluídos na sua análise foi muito pequena para ter conclusões definitivas e que os estudos analisados apresentavam baixo número de pacientes e não possuíam controles apropriados (LEE et al., 2008). Jae-Dong Lee e colaboradores, num estudo em que revisou os estudos disponíveis sobre o efeito da apipuntura no tratamento da artrite, conclui que a apipuntura é

uma área de pesquisa promissora, no entanto existem evidências limitadas a respeito da eficácia do apipuntura na artrite. Estes autores recomendam estudos clínicos com maior número de pacientes e com desenho experimental adequado para que este efeito seja comprovado. Além disso, eles também recomendam que nos próximos estudos sejam analisadas doses e concentrações ótimas de BV (LEE et al., 2005).

Em cães, apesar da apipuntura ser utilizada em vários países, em terapias tradicionais, não foi encontrado nenhum estudo científico de circulação ocidental sobre o efeito terapêutico do BV.

2.3. Efeitos tóxicos do Veneno de Abelhas

2.3.1. Efeitos terapêuticos x efeitos tóxicos do Veneno de Abelhas

Apesar do grande entusiasmo a respeito do potencial terapêutico do BV, não devemos esquecer que acidentes com ataques de abelhas podem ser fatais. Estes acidentes podem ocorrer de duas maneiras distintas: reações anafiláticas algumas vezes fatais devido a picada de apenas uma ou algumas abelhas; e ataques violentos de centenas a milhares de abelhas que causam dano sistêmico severo e alta mortalidade (SCHUMACHER e EGEN, 1995; VETTER et al., 1999).

As reações anafiláticas não são dose dependente, podem ser induzidas com pequena quantidade de veneno e ocorrem apenas em indivíduos alérgicos. A exata incidência de reações anafiláticas em animais de companhia é desconhecida, em seres humanos estima-se em torno de 1 a 3%. Os sinais de anafilaxia aparecem geralmente após 15 minutos após a picada. Em cães se a reação alérgica sistêmica não ocorrer em até 30 minutos dificilmente ocorrerá (FITZGERALDE FLOOD, 2006).

Anafilaxia é mediada por IgE. Em indivíduos que tenham sido previamente sensibilizados por veneno de abelhas, IgE sensibiliza mastócitos e basófilos pela ligação ao receptor de alta afinidade ao IgE (FceRI) expresso em sua superfície. Após a ligação do complexo IgE-FceRI pelo alergênico, mastócitos e basófilos sofrem desgranulação e liberam aminas vasoativas (principalmente histamina), mediadores lipídicos (prostaglandinas e cistenoilileucotrienos), citocinas e quimocinas, que vão caracterizar a fase imediata da reação alérgica (LARCHE et al., 2006). Reações anafiláticas não são dependentes do número de picadas, e animais alérgicos ao veneno de abelhas e vespas desenvolvem reação de ardência no local da inoculação mesmo com apenas uma picada. Quanto menor o intervalo entre a picada e o início dos sinais, mais severa será a reação anafilática. Uma fulminante cascata de reações podem facilmente seguir um pequeno sinal clínico inicial, a morte pode ocorrer em poucos minutos (FITZGERALDE FLOOD, 2006).

Em caso de acidentes com múltiplas picadas, podemos considerar que a dose letal na maioria dos mamíferos é de aproximadamente 20 picadas por quilo de peso. Estima-se que a abelha melífera europeia injete 147 µg de veneno por picada (FITZGERALDE FLOOD, 2006), o que resultaria numa dose de aproximadamente 3 mg/kg. No entanto, existem relatos que acidentes com 500 picadas ou mais podem ser fatais para humanos (SCHUMACHER e EGEN, 1995; VETTER e VISSCHER, 1998; VETTER et al., 1999); considerando um adulto médio de 70 kg, a dose letal estaria, neste caso, em torno de 1,07 mg/kg. Grissoto e colaboradores observaram que uma única dose de 0,5 mg/kg em ratos é capaz de induzir insuficiência renal aguda mediada principalmente por vasoconstrição, nefrotoxicidade direta e rabiomíolise (GRISOTTO et al., 2006). Em animais de laboratório, a maioria dos estudos sobre a apipuntura utilizam doses que variam em torno de 0,25 a 0,08 mg/kg; sendo em muitos casos utilizadas doses repetidas. Nestes estudos experimentais não foi avaliado o potencial

tóxico destas aplicações, no entanto não há relatos nestes artigos de efeitos colaterais da apipuntura (KWON et al., 2001b; KWON et al., 2001c; LEE et al., 2001; KWON et al., 2003).

Numa sessão de apiterapia em humanos e em animais, o veneno de abelhas pode ser aplicado utilizando a própria abelha ou uma solução de veneno de abelha diluída em salina. Na prática da apiterapia em humanos, são aplicadas picadas em número crescente. Na Conferência Mexicana de Apiterapia de 1996, o Dr Fernando López Hernández, utiliza terapia usada e agressiva para condições tais como herpes, colite, artrite, enxaqueca, vertigem, enfisema, cicatrizes queloidais, nervosismo e ansiedade, insônia, varizes, asma, problemas de sinusite e mal de Parkinson. Nestes tratamentos podem chegar a até 150 picadas numa única sessão¹. Esta quantidade de veneno, principalmente se usado repetidamente (22,5mg de BV), provavelmente pode produzir efeitos tóxicos. Já a maioria dos estudos clínicos sobre a eficácia da apipuntura utiliza veneno diluído em salina, normalmente na concentração de 0,03%, sendo aplicados 0,1ml por ponto, no total de no máximo 1ml por sessão, ou seja no máximo 0,3mg por pessoa. Se considerarmos um adulto de 70kg, a dose neste caso, seria de 4,3µg/kg por sessão, o que estaria entre 236 a 678 vezes menor que a dose letalmente tóxica (obviamente em indivíduos não alérgicos). Apesar de improvável, como não foram encontrados relatos na literatura científica que sobre a toxicidade destas diluições de BV em humanos, não podemos descartar completamente que o veneno nestas diluições possa causar efeitos tóxicos.

Em cães, a diluição geralmente utilizada é de 0,002% de BV em salina, sendo aplicados até 1ml por sessão, ou seja 0,02mg/animal (comunicação pessoal de Sagiv Ben-Yakir, veterinário acupunturista). Considerando um animal de 10 kilos, a dose seria neste caso de 2µg/kg. No entanto, em cães devido a variação de peso entre as raças (de 800g a até 70kg), a dose (mg/kg) pode variar extremamente. No caso de animais pequenos, numa situação extrema, se injetarmos 1ml de uma solução 0,03% de BV, a mesma utilizada em humanos (ou seja 0,3mg) num animal de 1 kg por exemplo, estaríamos utilizando uma dose de 0,3mg/kg. Esta dose poderia ser tóxica uma vez que a dose de 0,5mg/kg já provoca insuficiência renal aguda em ratos. Além disso, na ausência de estudos prévios, não podemos afirmar que a utilização de doses mais diluídas de BV como a de 0,02mg/animal não produza efeitos tóxicos em cães.

2.3.2. *Sinais clínicos e manifestações de acidentes com abelhas*

Existem cinco tipos de reações a picadas: normal, local, rara, tóxica e anafilática. A reação normal geralmente ocorre um eritema leve, edema e dor; é transitória (terminam espontaneamente em 24h) e é tratada com uma compressa gelada e substâncias analgésicas. A reação local extensa (3 a 4cm) tem de 7 a 17% de incidência na população geral, tem eritema e edema extenso e pode durar de 1 a 10 dias (GUPTA e GRAMMER, 2004). Esta reação também é chamada de celulite embora as infecções raramente acompanhem as picadas de insetos. Reação menos comum é o edema de orofaringe, que pode resultar em comprometimento das vias aéreas. Fatalidades podem ocorrer por oclusão das vias aéreas devido a picadas na região da cavidade oral. O tratamento para reação local extensa é realizado através de analgésicos, gelo e raramente prednisona. Indivíduos que desenvolvem reações locais extensas tendem a ter uma reação similar a uma picada subsequente. O risco de anafilaxia nestes indivíduos é de 3 a 10% (REISMAN, 2002). Infelizmente, testes de pele e RAST não podem distinguir indivíduos que terão reações anafiláticas e daqueles que terão reações locais extensas no futuro. A reação rara inclui

¹Michael McCulloch, L. Ac, em www.esclerosemultiplaabelhas.blogspot.com.br
Acessado em 17/09/2012; 8h35min.

alterações séricas, que incluem urticária, artralgias, maláxia e febre de 7 dias após a picada de inseto. Duas semanas após a picada ainda podem ocorrer reações neurológicas, nefrite, vasculite e sintomas semelhantes a encefalite. As reações tóxicas ocorrem em caso de múltiplas picadas e resultam em hipotensão, colapso cardiovascular e possivelmente morte. O quinto tipo de reação é a anafilaxia (GUPTA e GREENBERGER, 2004).

A reação anafilática por picada de inseto não é diferente das outras reações anafiláticas. O início dos sinais fatais podem ocorrer rapidamente (frequentemente em 10 minutos). Ainda é desconhecido porque as reações de anafilaxia podem variar em severidade (LUDOLPH-HAUSER et al., 2001). A reação anafilática moderada inclui urticária, prurido e angioedema; em outros casos ocorre vômito e diarreia. Sinais mais sérios de anafilaxia comprometem os sistemas respiratório e cardio-vasculares. Respiração ruidosa, dispnéia, tosse, e broncoconstrição podem ocorrer causando a hipóxia e respiração difícil. Edema local das vias aéreas provoca congestão de laringe, epiglote e tecidos adjacentes. Os sinais de anafilaxia em cães incluem micção, emese, defecação, fraqueza muscular, depressão respiratória e finalmente o choque. Os sinais ocorrem geralmente após 15 minutos, geralmente se não ocorrer em 30 minutos dificilmente ocorrerá. A morte ocorre geralmente 60 minutos após a picada inicial. Os sinais de anafilaxia são atribuídos a antígenos induzidos por liberação de IgE e formação de mediadores químicos com alvo na musculatura lisa e vasos sanguíneos. Em pacientes com sinais clínicos instáveis após a apipuntura deve se sempre considerar a possibilidade de anafilaxia seguida de distúrbios da coagulação (JUNKET et al., 2012).

Os efeitos tóxicos diretos do veneno são independentes de mecanismos imunológicos, mas são dependentes do volume de veneno. Animais que sofreram envenenamento massivo por múltiplas picadas apresentam febre e estarão visivelmente deprimidos. Paralisia facial, ataxia, choque, e sinais neurológicos podem ser observados. Urina marrom escura ou avermelhada, sangue nas fezes, vômito marrom escuro ou com sangue também podem ser vistos. Infarto do miocárdio também é relatado em picada de insetos. Um hemograma completo apresentaria leucocitose, trombocitopenia, particularmente quando em coagulação intravascular disseminada iminente. Cilindros granulosos são encontrados em urinálise, refletindo lesão tubular renal, devido a natureza nefrotóxica do veneno de abelha. Insuficiência renal aguda pode ser causada por necrose tubular aguda (resultado de hemólise) ou efeitos tóxicos diretos do veneno que causa rabdomiólise, hemólise, e insuficiência renal aguda com toxicidade tubular direta (COWELL e COWELL, 1995). Cães que sofreram múltiplas picadas podem desenvolver de forma secundária anemia hemolítica imunomediada.

Reações tardias são incomuns, mas incluem alterações séricas, vasculite, glomérulo nefrite, neuropatia, coagulação intravascular disseminada e artrite (RICHESE et al., 2002).

2.3.3. Tratamento do envenenamento

Na ocorrência de uma única picada, geralmente a aplicação local de gelo, compressas geladas e antihistamínicos são suficientes para aliviar o edema e o desconforto. A maior parte das reações locais se resolvem completamente sem tratamento em poucas horas. Mais severas, as reações regionais e as que envolvem múltiplas picadas devem ser inicialmente tratadas como as reações locais moderadas. Entretanto o animal deve ser hospitalizado e monitorado de perto quanto ao início de sintomas da síndrome de envenenamento. Recomenda-se a administração de corticosteróides (succinato de prednisolona sódica 10mg/kg IV, seguido de prednisolona oral na dose de 1mg/kg BID por 3 a 5 dias) e a reposição de fluidos e eletrólitos para a correção da hipotensão e prevenção da estase vascular. Reações tóxicas por envenenamento massivo, requerem agressiva e precoce estabilização e terapia com fluidos, corticóides e atualmente requerem monitoramento dos parâmetros hematológico, cardíaco,

respiratório e renal por vários dias. Septicemia é uma reação possível, justificando a administração de antibióticos de amplo espectro (COWEL & COWEL, 1995).

No caso das reações anafiláticas, como as mortes ocorrem até uma hora após a(s) picada(s) é fundamental que o monitoramento e o tratamento sejam precoces e intensivos. Imediatamente deve ser utilizada solução de epinefrina 1:1000 (0,1 a 0,5 ml) por via subcutânea (COWEL & COWEL, 1995), podendo ser repetida a cada 10 a 20 minutos. Se for necessária a administração de epinefrina intravenosa, esta deve ser diluída 1:10000 e administrada 0,5 a 1,0 ml, cautelosa e lentamente ao mesmo tempo em que o animal é monitorado quanto a ocorrência de arritmia cardíaca. O monitoramento deve estar atento ao batimento cardíaco, ritmo cardíaco, e pressão sanguínea. A epinefrina controla a vasodilatação e o edema subsequente impedindo a propagação da anafilaxia. Fluidos intravenosos são essenciais para prevenção do colapso circulatório e soluções de cristalóides podem ser administrada rapidamente (90 ml/kg-cão). Anti-histamínicos e corticosteróides também são necessários, visando o bloqueio de receptores antihistamínicos e estabilização de células mastocitárias, respectivamente. Monitoramento das vias aéreas, com intubação orotraqueal e oxigênio suplementar devem ser avaliados quanto a necessidade.

O prognóstico da maioria das vítimas de picadas de insetos é excelente. Muitos episódios são autolimitantes e a anafilaxia é determinada na primeira hora. Se os sinais não ocorrerem em 30 minutos dificilmente ocorrerá (FITZGERALD e FLOOD, 2006).

2.3.4. Protocolo de tratamento da anafilaxia e reações sistêmicas:

O paciente é posicionado em decúbito lateral, com a cabeça levemente estendida, seguida de aplicação de epinefrina 1:1000 de 0,1 a 0,5 ml (0,01 mg/kg) por via subcutânea, podendo ser repetida após 10 a 20 minutos. A administração de epinefrina endovenosa deve ser diluída 1:10000 e administrada 0,5 a 1,0 ml, lentamente monitorando possível progresso ou arritmia cardíacas (FITZGERALD e FLOOD, 2006). Em casos de obstrução das vias aéreas, insuficiência respiratória, ou inconsciência, deve ser realizada a intubação endotraqueal, e administração de oxigênio suplementar, acompanhado de administração de antihistamínico – Difenildramina (*Benadryl* – 0,5 a 2,2 mg/kg-IM, EV lento), para neutralizar receptores histamínicos. A infusão de cristalóides isotônicos (solução de Ringer Lactato, Solução salina a 0,9%-EV) auxilia na prevenção do colapso circulatório e manutenção da diurese.

A administração de dopamina como vasopressor (5 a 20 mcg/kg/min, em infusão contínua) em casos refratários deve ser considerada. O tratamento do broncoespasmo deve ser feito por administração de agonista β_2 (Terbutalina- 0,01 mg/kg Sc). Glicocorticóides (fosfato sódico de dexametasona, 2 a 8 mg/kg- EV lento, ou succinato sódico de prednisona, 11 a 30 mg/kg-EV), pode ser administrado e mantido a cada 12 horas via oral em animais com sinais leves de anafilaxia, para estabilizar células mastocitárias e basófilos. Uso de antibióticos de largo espectro seria avaliada em casos graves ou evidência de infecção (Ceftriaxona- 30 mg/kg EV). O animal necessitaria de monitoramento intensivo, quanto aos parâmetros fisiológicos até a estabilização do quadro.

Um cateter uretral seria colocado para monitoramento do volume urinário. Teste bioquímico seco rápido de urinalise com fita reagente (Comburtest-Roche) seria realizado para detecção de possível mioglobinúria e rabdomiólise. A alcalinização da urina seria necessária nesses casos (de sódio 1 a 2 mEq/kg EV a cada 3 ou 4 horas, no fluido de reposição). Em caso de rabdomiólise Bicarbonato ou oligúrica grave, Manitol EV (0,1 a 0,5 g/kg) e diuréticos de alça (furosemida 2 a 5 mg/kg EV a cada 1 h), ou doses baixas de Dopamina (1 a 3 mcg/kg/min) (Gfeller e Messonier) deveriam ser consideradas.

2.3.5. Prevenção e Controle das possíveis reações alérgicas durante a apiterapia

Antes do início do tratamento com veneno de abelhas, é fundamental que seja investigado se o paciente é alérgico ao veneno. Para isso, além de uma anamnese sobre o histórico de alergia a picada de insetos deve-se fazer um teste cutâneo onde uma pequena quantidade de veneno é injetado no paciente e é verificado se a reação local é exagerada. Em alguns países europeus, é exigido a mensuração dos níveis de IgE específica de veneno de abelha.

Estas medidas de prevenção auxiliam enormemente no diagnóstico de pacientes que não podem receber a apiterapia. No entanto é aconselhável que em cada sessão de apiterapia estejam disponíveis medicamentos para o tratamento de uma possível reação anafilática (adrenalina, corticóides, anti-histamínicos). Esta medida preventiva é importante já que a reação anafilática apesar de rara pode ocorrer em pacientes que não apresentam os níveis de IgE aumentados ou teste cutâneo positivo para BV (GOLDEN et al, 2001). Importante ressaltar que a detecção de IgE específica aumentada somente indica que houve sensibilização pelo alérgeno, porém para sua correta interpretação é necessário considerar os resultados dos testes em conjunto com a história clínica (DAHER, 2009).

2.4. Avaliação da Resposta cutânea local a substâncias irritantes

Um dos objetivos da apiterapia é que a injeção do BV provoque irritação local e conseqüentemente intensifique e prolongue a estimulação de pontos de acupuntura. Desta forma, é necessário avaliar se doses diluídas de BV podem produzir uma irritação cutânea significativa. Um dos métodos quantitativos não invasivos para medir a resposta cutânea é a avaliação da distensão tecidual associada ao processo inflamatório incitado por substância irritante injetada no pavilhão auricular de cães. A aplicação provoca um edema que é resultante do aumento local da permeabilidade dos vasos da microcirculação e o acúmulo de células inflamatórias como conseqüência do fenômeno de quimiotaxia. Como a injeção é no pavilhão auricular, este teste cutâneo permite uma análise quantitativa através da mensuração do grau de distensão tecidual, e qualitativa pelo surgimento temporal do “tumor”. Se a aplicação fosse realizada em outra região do corpo a análise quantitativa não seria possível.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 12 cães, da raça Beagle, de ambos os sexos, de idade entre 1 a 8 anos de idade, pesando entre 10 e 15kg, em boas condições de saúde, vermifugados e vacinados, provenientes do criadouro do departamento de Parasitologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e a realização dos procedimentos experimentais realizados nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental e Parasitologia Veterinária do mesmo departamento.

Todos os animais foram submetidos a uma avaliação clínica, dermatológica e laboratorial preliminar. Foram descartados animais com histórico de alergias, ou utilizados em experimentos anteriores ou paralelos que pudessem interferir nos resultados

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ sob o número de processo 23083.010063/2009-43 e está de acordo com as normas internacionais de Utilização de animais em pesquisa.

Desenho Experimental

Foram constituídos três grupos de animais: grupo controle que recebeu salina e outros dois grupos que receberam diferentes doses de BV (*Apis mellifera*, Sigma®, USA) (ver a seguir). O veneno diluído foi aplicado em dose única no pavilhão auricular de cães e posteriormente verificado em diferentes tempos as reações locais de Hipersensibilidade imediata e tardia, as respostas autonômicas e as alterações hematológicas e bioquímicas.

Grupos

Grupo Controle: injeção de 0,1 ml de salina (0,9% de NaCl) no pavilhão auricular esquerdo e no pavilhão auricular direito.

Grupo 0,043mg de BV/animal: injeção 0,1 ml de uma solução de 0,43mg/ml de BV diluída em salina no pavilhão auricular esquerdo e de 0,1ml de salina no pavilhão auricular direito.

OBS.: Esta dose representa a quantidade de veneno utilizada em humanos corrigida pelo peso do animal. Assim, se 0,3mg de BV é utilizado em humanos e se considerarmos um adulto de 70Kg, um cão de 10 Kg deveria receber 0,043mg. Neste caso esta dose de 4,3µg/kg seria 678 vezes menor que a dose de 3mg/Kg letalmente tóxica para mamíferos (0,1 ml de uma solução de 0,43mg/ml de BV diluída em salina, ou seja 43µg o que equivale 1/3 da quantidade de veneno de uma picada de abelha).

Dose de 0,3mg de BV/animal: injeção 0,1 ml de uma solução de 3mg/ml de BV diluída em salina no pavilhão auricular esquerdo e de 0,1ml de salina no pavilhão auricular direito.

OBS.: Esta dose é a mesma dose de BV utilizada na apiterapia em humanos sem correção de peso do animal. Considerando que um cão da raça Beagle tem aproximadamente 10kg, esta dose seria de 0,03mg/Kg, ou seja 100 vezes menor que a dose de 3mg/Kg letalmente tóxica

para mamíferos. (0,1 ml de uma solução de 3mg/ml de BV diluída em salina, ou seja 300µg o que equivale a duas picadas de abelha).

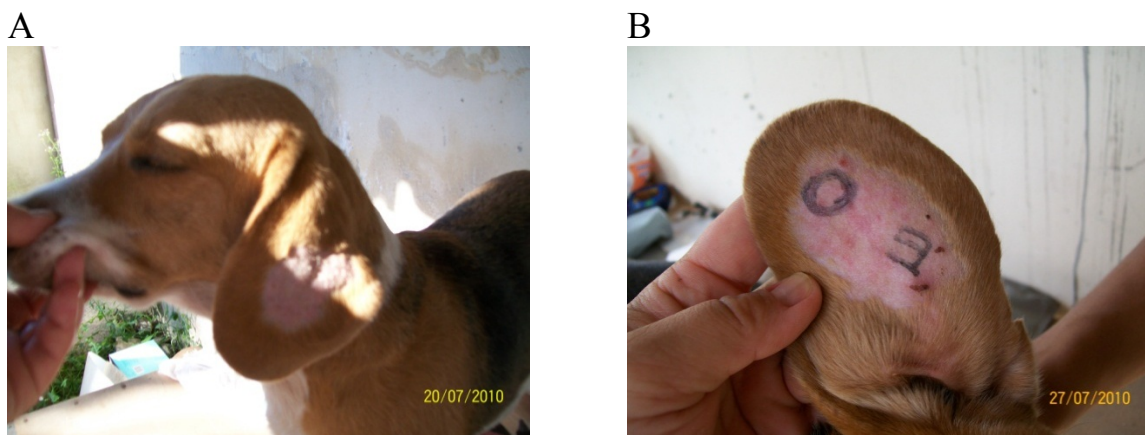


Figura 2: Fotografia do preparo do local de inoculação do BV (A) e da orelha antes a inoculação do veneno em B.

Análise da reação tecidual local

No dia anterior ao experimento, os animais foram pesados, realizada uma avaliação clínica, dermatológica e laboratorial e os tratadores responderam a uma anamnese onde foram descartados cães com histórico de alergias e outras doenças, bem como envolvimento com outros experimentos anteriores. Foi realizada então uma tricotomia da metade superior das faces interna e externa de ambos os pavilhões auriculares.

No dia do experimento a área depilada no dia anterior foi desengordurada com éter e álcool iodado, respectivamente, e foi marcada, uma circunferência de 1 cm de diâmetro a 3,5 cm do ápice do pavilhão e a 1,5 cm de seu bordo cranial. Em seguida, com o auxílio de um espessímetro de papel (Mitutoyo, indústria brasileira) foi medida a espessura dos pavilhões auriculares nas áreas marcadas. Posteriormente foi inoculado intradermicamente, no local marcado do pavilhão auricular esquerdo, 0,1 ml uma solução de diferentes concentrações de veneno de abelha ou de salina (de acordo com o grupo). Igual volume de salina foi injetado no pavilhão direito para controle das reações inespecíficas induzidas pelo ato da injeção. Este teste foi proposto por SZABÓ, MORELLI e BECHARA em 1995 para avaliação da reação tecidual em cães.

A avaliação da reação local foi realizada através da mensuração da espessura dos pavilhões auriculares nos seguintes tempos pós inoculação: 5, 10, 15, 30 minutos, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. A resposta cutânea local foi calculada através da mensuração da distensão tecidual relativa, onde a distensão (diferença entre a espessura em mm em cada tempo teste e a medida basal) da orelha direita (inoculada com salina) foi diminuído da distensão da orelha esquerda (inoculada com o veneno de abelhas diluído), segundo o cálculo:

$$\text{Distensão tecidual relativa} = (ETOE - EBOE) - (ETOD - ETOD).$$

Onde,

ETOE = espessura no tempo teste da orelha esquerda

EBOE = espessura basal da orelha esquerda

ETOD = espessura no tempo teste da orelha direita

ETOD = espessura basal da orelha direita



Figura 3: Fotografia ilustrando o método de mensuração da distensão tecidual.

Avaliação das respostas clínicas

Os animais foram monitorados quanto às alterações de comportamento e respostas autonômicas induzidas pelo veneno de abelha. Os parâmetros cardiovasculares (frequência cardíaca e pressão arterial) e respiratório (frequência respiratória) foram avaliados 30 minutos, 1, 6, 18, 24, 48 e 72 horas após o veneno e comparados com referenciais pré-veneno.

Todas as respostas comportamentais indicadoras de ansiedade e dor (como agitação, prurido local, balançar a cabeça) também foram anotadas, assim como a ocorrência e frequência de vômito, diarreia e micção. Os cães foram acompanhados continuamente por um médico veterinário durante as seis primeiras horas após a injeção do veneno.

Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial foi avaliada nos momentos 0,30min, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação do BV, utilizando método clínico com aparelho de pressão com braçadeira neonatal (marca BD) e auxílio de Doppler vascular (Medmega-DV 610), para detecção a interrupção do fluxo sanguíneo da artéria radial.

Gradação das Possíveis reações analifáticas

As reações anafiláticas foram graduadas de acordo com o quadro abaixo, modificada da Classificação de Mueller de reações sistêmicas:

Quadro 1. Classificação de Mueller

Classificação das reações sistêmicas de Mueller (modificada para cães):
Grau 1: urticária generalizada, prurido, desconforto e ansiedade
Grau 2: Qualquer dos itens acima mais dois ou mais de: angioedema, constrição torácica, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal e tontura
Grau 3: Qualquer dos itens acima mais dois ou mais de: dispnéia, dificuldade de respirar, estertor, fraqueza, confusão, latido confuso
Grau 4: Qualquer dos itens acima mais dois ou mais de: queda da pressão arterial, colapso, desmaio, incontinência, cianose.

Tratamento das possíveis respostas de anafilaxia

Caso os animais que apresentassem os primeiros sinais de anafilaxia seriam medicados com uso de antihistamínicos, corticosteróides, oxigênio suplementar, soluções eletrolíticas, broncodilatadores, diuréticos, anticonvulsivos, epinefrina, de acordo com a gravidade do quadro, segundo a classificação de Mueller.

Avaliação Hematológica e bioquímica do sangue

Amostras de 8ml de sangue foram colhidas nos tempos 0 (antes da inoculação), 6, 12, 24, 72 horas após a inoculação do veneno de abelha e separadas em duas alíquotas. Uma alíquota foi utilizada para realização de hemograma em tubos coletores pediátricos contendo EDTA (Vacutainer-BD), homogeneizadas e mantidas sob refrigeração até o processamento do hemograma. A segunda alíquota, utilizada para realização de exames de bioquímica clínica, foi acondicionada em tubos coletores sem anticoagulante (Vacutainer-BD), mantidos em posição supino e refrigeradas até o momento da centrifugação. Todas as alíquotas foram identificadas pelo número do microchip de cada animal e a hora da coleta.

O processamento do hemograma foi feito em até 24 horas após a coleta. Antes de decorridas 3 horas, foi realizado o esfregaço sanguíneo corado pelo método Panótico rápido (InstantProv-Newprov) para a contagem diferencial de leucócitos por microscopia. A contagem total de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e determinação da hemoglobina, foi realizada em contador automático de células sanguíneas Contador Hematológico poH IV-Diff).

Para os exames de bioquímica clínica, antes de decorridas 24 horas da coleta, as amostras de sangue sem aditivo serão centrifugadas a 2500rpm, por 15 minutos, o soro separado com pipeta automática e acondicionados em microtubos tipo Eppendorf e armazenadas em freezer a -80°C.

A função renal foi avaliada por determinação da uréia (método enzimático) e creatinina (método cinético), em espectrofotômetro (BIOESPECTRO SP 22). Nestes testes foram utilizados kits reagentes da marca Doles com processamento de acordo com o fabricante.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. As diferenças estatísticas foram analisadas pela Análise de Variância (Anova) de duas vias para medidas repetidas com os fatores tratamento (grupos controle, 0,043mg/kg BV e 0,3mg/kg de BV/animal) e tempo (diferentes tempos de acordo com o parâmetro analisado). Em caso de valores de Anova significativos ($p < 0.05$) foi realizado o teste *post-hoc* de Bonferroni para a detecção de diferenças entre pares de grupos.

Os dados foram analisados e os gráficos construídos no programa GraphPad Prim 5.0.

4. RESULTADOS

Reação cutânea local

A resposta cutânea local foi avaliada através da mensuração da distensão tecidual relativa, onde a distensão (diferença entre a espessura (mm) em cada tempo teste e a medida basal) da orelha esquerda (inoculada com salina) foi diminuído da distensão da orelha direita (inoculada com o veneno de abelhas diluído) (ver cálculo no item de material de métodos).

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento ($F_{(2,81)}=6,67$; $p=0,0167$) e tempo ($F_{(9,81)}=4,76$; $p<0,0001$). O teste post-Hoc de Bonferroni detectou diferença entre os grupos CTL e 0,3mg/kg nos momentos 1h ($p<0,05$), 6h ($p<0,001$), 12 ($p<0,05$) e 24 horas ($p<0,05$) após inoculação do veneno. Enquanto que não houve diferença significativa entre os grupos CTL e 0,043mg/kg.

Estes resultados sugerem que o a aplicação de 0,3mg/kg de BV produziu maior distensão tecidual relativa quando comparada ao controle, e que a diluição de 0,043mg/kg de BV/animal apresentou uma resposta intermediária não sendo estatisticamente diferente dos demais grupos. Além disso, a diluição de 0,3mg/kg de BV provocou um pico distensão de 6 horas após a inoculação do veneno.

Análise comportamental

Após as aplicações do veneno de abelha no pavilhão auricular direito e de solução salina no pavilhão auricular esquerdo, os animais foram colocados em canis tipo gaiola e seus comportamentos foram observados e anotados a fim de identificar possíveis reações de anafilaxia e dor. Em todos os grupos o comportamento observado resumiu-se em balançar a cabeça imediatamente após a aplicação, coçar os dois locais de aplicação com os membros posteriores. Este comportamento foi observado por menos de 30 segundos após a inoculação. Em nenhum grupo foi notado qualquer alteração comportamental indicativa de anafilaxia ou alterações no consumo hídrico ou alimentar. De uma maneira geral, os animais apresentaram somente prurido leve na primeira hora após aplicação e somente um animal do grupo 0,043mg (a405662) apresentou prurido leve durante as primeiras 48 horas com formação de pequena escarificação no local de aplicação do BV. Nos demais animais nenhuma escarificação indicando prurido mais prolongado ou intenso foi identificado, e a pele permaneceu íntegra na face interna e externa do pavilhão auricular.

Todos os cães possuíam comportamento extremamente afável e mantiveram esta característica durante todo o desenvolvimento do experimento.

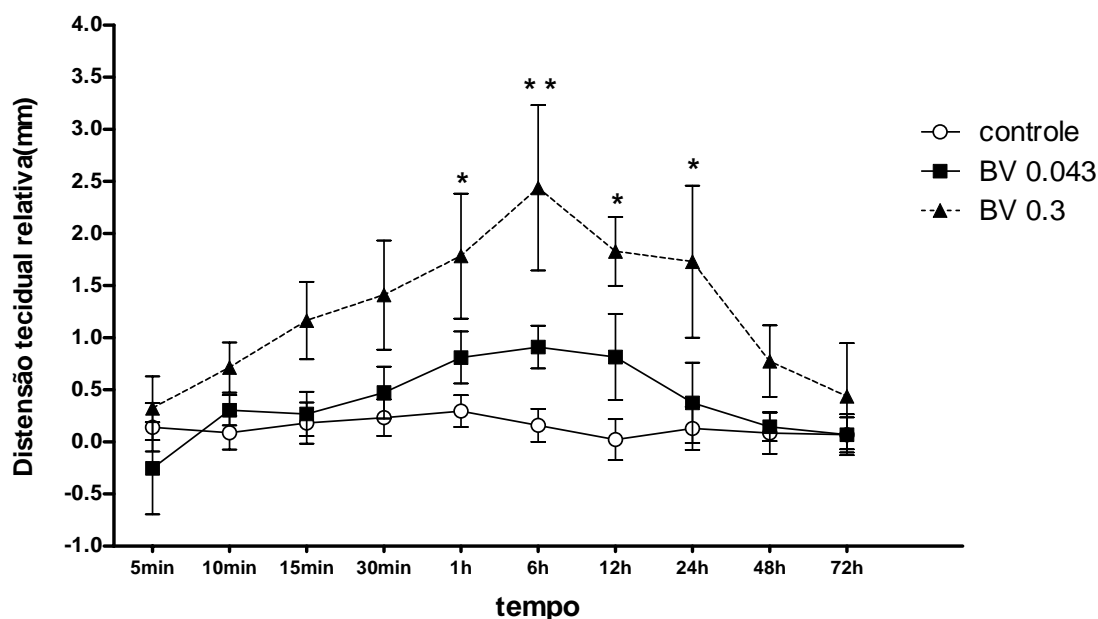


Figura 4: Avaliação da resposta cutânea local a doses diluídas de veneno de abelhas (BV). 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foram injetados no pavilhão auricular de cães Beagles. A distensão tecidual relativa foi calculada pela diferença do aumento da espessura (mm) das orelhas em cada tempo teste. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento ($F_{(2,81)}=6.67$; $p=0,0167$), tempo ($F_{(9,81)}=4.76$; $p<0,0001$). * indica $p<0,05$ em relação ao grupo CTL, ** indica $p<0,001$ em relação ao grupo CTL. Dados apresentados como média \pm sem.

Reações anafiláticas

Nenhum animal deste experimento apresentou reação indicativa de anafilaxia, como urticária, agitação, vômito, diarreia, dispnéia, desconforto, tontura, dor abdominal, constrição torácica, estertor, fraqueza, colapso desmaio ou cianose.

Temperatura Corporal

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa nos fatores tempo, interação e tratamento. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere na temperatura corporal.

Tabela 2: Influência de doses diluídas de veneno de abelha na temperatura corporal de cães (média \pm sem).

Tempo	Controle salina	0,043mg/animal	0,3mg/animal
0	38,3 \pm 0,170	38,4 \pm 0,155	38,2 \pm 0,217
30'	38,0 \pm 0,256	38,0 \pm 0,047	38,3 \pm 0,085
1h	38,0 \pm 0,265	38,2 \pm 0,108	38,0 \pm 0,366
6h	38,0 \pm 0,268	38,3 \pm 0,110	37,9 \pm 0,347
12h	38,0 \pm 0,182	38,3 \pm 0,149	37,8 \pm 0,259
24h	37,8 \pm 0,070	38,4 \pm 0,070	37,8 \pm 0,165
48h	37,8 \pm 0,040	38,3 \pm 0,213	38,1 \pm 0,205

72h	38,2 ± 0,197	38,5 ± 0,204	38,0 ± 0,349
------------	--------------	--------------	--------------

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa.

Pressão Arterial

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa para o fator tempo ($F_{(7,63)}=5,55$; $p<0,0001$), enquanto os fatores tratamento e interação não foram significativos.

Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere na pressão arterial. No entanto neste experimento podemos notar que a pressão arterial apresentou um declínio gradual com o tempo. Provavelmente relativo a adaptação dos animais ao experimentador.

Tabela 3: Influência de doses diluídas de veneno de abelha na Pressão arterial Média de cães (média ± sem).

	Controle salina	0.043mg/animal	0.3mg/animal
0	117,5 ± 20,258	118,1 ± 17,893	111,0 ± 14,497
30'	116,2 ± 21,638	116,2 ± 18,185	109,3 ± 13,631
1h	115,0 ± 21,889	116,8 ± 17,776	108,7 ± 14,049
6h	113,7 ± 22,488	116,2 ± 16,250	103,7 ± 12,644
12h	112,5 ± 22,867	115,6 ± 16,657	104,3 ± 12,178
24h	110,0 ± 23,363	116,2 ± 17,365	106,2 ± 13,900
48h	103,7 ± 18,860	113,1 ± 17,421	105,6 ± 12,432
72h	106,2 ± 16,754	108,7 ± 17,603	103,1 ± 13,360

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa apenas para o fator tempo ($F_{(7,63)}=5,55$; $p<0,0001$).

Frequência Cardíaca

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados: tempo, interação e tratamento. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere na frequência cardíaca de cães.

Tabela 4: Influência de doses diluídas de veneno de abelha na frequência cardíaca de cães (média ± sem).

Tempo	Controle salina	0.043mg/animal	0.3mg/animal
0	89,0 ± 5,744	100,0 ± 3,265	97,0 ± 4,725
30'	85,5 ± 7,500	94,0 ± 2,000	96,0 ± 6,928
1h	91,0 ± 5,972	98,0 ± 8,406	98,0 ± 6,831
6h	99,0 ± 8,266	96,5 ± 3,095	108,0 ± 7,118

12h	90,0 ± 4,760	103,0 ± 5,259	102,5 ± 8,539
24h	85,0 ± 3,415	103,5 ± 4,924	103,0 ± 3,415
48h	87,0 ± 5,259	91,5 ± 2,061	96,0 ± 2,828
72h	90,5 ± 6,238	93,5 ± 4,716	100,0 ± 1,632

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados.

Frequência Respiratória

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa para os fatores interação, tempo e tratamento. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere na frequência respiratória de cães.

Tabela 5: Influência de doses diluídas de veneno de abelha na frequência respiratória de cães (média ± sem).

Tempo	Controle salina	0.043mg/animal	0.3mg/animal
0	56,5 ± 8,341	72,7 ± 11,455	95,0 ± 36,819
30'	56,0 ± 9,092	66,7 ± 7,972	100,0 ± 57,457
1h	59,0 ± 7,549	69,0 ± 11,239	99,0 ± 49,836
6h	105,0 ± 22,173	60,0 ± 11,195	96,0 ± 50,780
12h	83,0 ± 9,574	106,0 ± 39,648	64,0 ± 14,142
24h	58,0 ± 6,633	99,5 ± 21,823	61,0 ± 10,246
48h	74,0 ± 14,094	82,5 ± 21,929	67,0 ± 11,474
72h	76,0 ± 10,708	72,0 ± 22,803	53,0 ± 8,544

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa nos fatores tempo, tratamento, e interação.

Avaliação Hematológica e bioquímica do sangue

SERIE VERMELHA

Hemácias

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa apenas para o fator tempo ($F_{(4,36)}=2,68$; $p=0,0468$), no entanto o teste *post-Hoc* de Bonferroni não detectou diferença significativa os tempos.

Hemoglobina

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere nos níveis de hemoglobina (g/dl de sangue) de cães.

Hematócrito

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento ($F_{(2,36)}=4,27$; $p=0,049$) e tempo ($F_{(9,36)}=3,09$; $p<0,027$). No entanto o teste

post-Hoc de Bonferroni não detectou diferença entre os pares grupos em nenhum dos tempos estudados. Podemos observar um declínio sutil do hematócrito principalmente nos animais controles, mas este não parece ser um fenômeno relevante já que não se relaciona com os demais parâmetros hematológicos.

Volume Globular Médio

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados. Como observado nos parâmetros anteriores, estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere no Volume Globular em cães.

Concentração de Hemoglobina Globular Médio

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados. Como observado nos parâmetros anteriores, estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere na Concentração de Hemoglobina Globular Médio de cães.

Plaquetas

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa apenas para o fator tempo ($F_{(4,36)}=3,75$; $p=0,0120$), no entanto o teste *post-Hoc* de Bonferroni não detectou diferença significativa entre os diferentes tempos. Esses dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere nos valores de plaquetas em cães.

Proteínas Plasmáticas

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa nos fatores tempo, tratamento e interação. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere nos níveis de proteínas plasmáticas de cães.

Apesar de alguns animais apresentarem no momento basal alguns valores hematológicos razoavelmente baixos, todos os animais apresentavam perfeitas condições clínicas e dermatológicas e não apresentaram variações significativas nestes parâmetros durante o experimento. Além disso, todos os grupos tinham animais nesta situação o que fortalece os nossos resultados.

SÉRIE BRANCA

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados: tratamento, tempo ou interação em nenhum dos parâmetros da Série Branca: leucócitos, segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos. Foram encontrados 02 bastões na amostra Basal do animal a44103 e 01 bastão no animal a417245 no tempo 48h. Foram encontrados 1 bastão no animal a080625, do grupo controle nos tempos: basal, 6h, 48h, 72h, e basófilos no tempo 72h e no animal a392630 nos tempos: basal, 24h, 48h, e 72h, nos tempos 24h e 72h foram encontrados basófilos.

Tabela 6: Influência de doses diluídas de veneno de abelha nos parâmetros hematológicos da série Vermelha de cães (dados apresentados como média \pm sem).

	Controle salina		0.043mg/animal		0.3mg/animal	
Hemácias(10000³μ/L) Δ						
0	5,0675	\pm 0,5265988	4,705	\pm 0,1577181	5,720	\pm 0,1228142
6	5,3225	\pm 0,4869013	4,650	\pm 0,1680774	5,7325	\pm 0,1152082
24	5,2575	\pm 0,6021126	4,6475	\pm 0,2383406	5,2825	\pm 0,1384663
48	5,225	\pm 0,4975691	4,6975	\pm 0,2418462	4,915	\pm 0,2257027
72	4,640	\pm 0,45356	4,455	\pm 0,1639867	5,045	\pm 0,1963203
Hemoglobina(g/dL)						
0	10,550	\pm 1,106421	10,375	\pm 0,3881045	11,875	\pm 0,2212653
6	11,175	\pm 0,9594921	10,200	\pm 0,3188521	11,825	\pm 0,1652019
24	11,075	\pm 1,26186	10,300	\pm 0,406202	11,025	\pm 0,1931104
48	10,875	\pm 1,081954	10,400	\pm 0,3851407	10,500	\pm 0,2738615
72	9,750	\pm 1,106421	9,925	\pm 0,1652019	10,475	\pm 0,383786
Hematócrito (%) Δ Y						
0	35,4	\pm 2,052	31,7	\pm 1,708	36,3	\pm 0,634
6	35,8	\pm 1,806	31,4	\pm 2,020	36,4	\pm 0,348
24	36,7	\pm 1,837	32,1	\pm 0,907	33,2	\pm 0,580
48	35,0	\pm 1,596	32,8	\pm 1,120	31,6	\pm 0,821
72	32,7	\pm 1,863	29,5	\pm 0,968	32,4	\pm 1,276
VGM (fl)						
0	64,7	\pm 1,799	66,0	\pm 0,976	63,8	\pm 0,668
6	65,8	\pm 2,139	64,6	\pm 2,451	63,5	\pm 0,730
24	64,7	\pm 2,047	66,7	\pm 0,473	63,1	\pm 0,749
48	64,9	\pm 1,995	67,3	\pm 0,887	64,6	\pm 1,918
72	67,5	\pm 1,935	66,9	\pm 1,061	64,1	\pm 0,729
CHGM(%)						
0	31,9	\pm 0,874	33,4	\pm 0,369	32,6	\pm 0,193
6	32,1	\pm 1,065	34,0	\pm 1,157	32,4	\pm 0,149
24	32,4	\pm 0,977	33,2	\pm 0,417	33,1	\pm 0,310
48	31,9	\pm 1,206	32,8	\pm 0,239	33,2	\pm 0,790
72	32,2	\pm 1,208	33,2	\pm 0,241	32,3	\pm 0,444
Plaquetasμ/L Δ						
0	143000,0	\pm 21897,49	142000,0	\pm 31630,68	169250,0	\pm 18445,30
6	173250,0	\pm 18503,94	169750,0	\pm 17960,03	158250,0	\pm 23474,72
24	167500,0	\pm 18821,53	175750,0	\pm 27762,01	165750,0	\pm 33956,77
48	158250,0	\pm 21218,60	161250,0	\pm 44690,30	136750,0	\pm 44735,10
72	107250,0	\pm 21703,97	144000,0	\pm 49195,19	118250,0	\pm 11664,58
PtnPlasmatica (g/dL)						
0	9,2	\pm 1,241	8,1	\pm 0,309	8,5	\pm 0,386
6	9,4	\pm 1,312	8,2	\pm 0,298	8,3	\pm 0,377
24	9,4	\pm 1,254	8,3	\pm 0,287	8,2	\pm 0,294
48	9,3	\pm 1,150	8,5	\pm 0,506	8,3	\pm 0,320
72	10,2	\pm 0,942	8,1	\pm 0,613	8,1	\pm 0,574

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles e o sangue coletado por punção venosa em diferentes tempos após inoculação. Δ e Y indicam $p < 0,05$ na ANOVA de duas vias para medidas repetidas no fator tempo/tratamento e respectivamente. O teste de pos-hoc de Bonferroni não detectou diferença entre os pares em nenhum tempo e parâmetro estudado.

Tabela 7: Influência de doses diluídas de veneno de abelha nos parâmetros hematológicos da série branca de cães (média \pm sem).

	Controle salina	0.043mg/animal	0.3mg/animal
Leucócitos			
0	9200, \pm 1739,732	9950, \pm 3022,278	12300, \pm 1706,849
6	9325, \pm 1028,247	11325, \pm 2931,261	12650, \pm 1632,228
24	8375, \pm 1605,395	12325, \pm 3392,977	11250, \pm 1500,278
48	8425, \pm 1540,225	11700, \pm 1860,555	11700, \pm 2553,755
72	8350, \pm 1708,069	9925, \pm 2535,539	9400, \pm 984,8858
Segmentados			
0	57,5 \pm 3,774	56,5 \pm 3,304	60,2 \pm 5,662
6	61,7 \pm 5,072	64,0 \pm 4,102	64,0 \pm 6,658
24	64,5 \pm 3,227	67,0 \pm 4,915	60,5 \pm 5,951
48	62,7 \pm 2,250	58,5 \pm 5,251	62,0 \pm 4,743
72	66,2 \pm 3,119	59,2 \pm 3,816	65,7 \pm 6,032
Linfócitos			
0	23,7 \pm 3,497	31,7 \pm 4,049	22,5 \pm 3,796
6	25,5 \pm 3,617	28,5 \pm 3,662	23,2 \pm 4,972
24	22,7 \pm 4,230	23,7 \pm 4,750	24,2 \pm 6,342
48	23,2 \pm 2,212	28,5 \pm 5,693	21,5 \pm 3,883
72	19,2 \pm 3,881	28,7 \pm 3,497	19,2 \pm 4,090
Monócitos			
0	6,2 \pm 1,376	3,7 \pm 1,493	4,2 \pm 1,436
6	6,2 \pm 2,286	3,7 \pm 1,314	2,2 \pm 1,314
24	5,5 \pm 2,217	5,0 \pm 0,408	4,2 \pm 1,030
48	6,0 \pm 0,816	5,2 \pm 1,652	5,2 \pm 0,750
72	6,0 \pm 2,677	6,5 \pm 1,554	4,7 \pm 1,436
Eosinófilos			
0	11,0 \pm 0,816	7,3 \pm 1,452	12,2 \pm 2,015
6	6,2 \pm 2,750	4,6 \pm 1,333	10,7 \pm 4,308
24	6,0 \pm 2,273	4,3 \pm 1,333	11,0 \pm 3,488
48	7,0 \pm 1,471	10,0 \pm 1,732	11,2 \pm 2,096
72	7,2 \pm 2,462	5,6 \pm 2,848	10,2 \pm 3,816

Uma solução de 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foi injetada no pavilhão auricular de cães Beagles e o sangue coletado por punção venosa em diferentes tempos após inoculação.

Ureia e Creatinina

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa em nenhum dos fatores estudados nos valores de creatinina e uréia. Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não interfere nos níveis de séricos de uréia e creatinina indicando estas doses não apresetam efeito nefrotóxico.

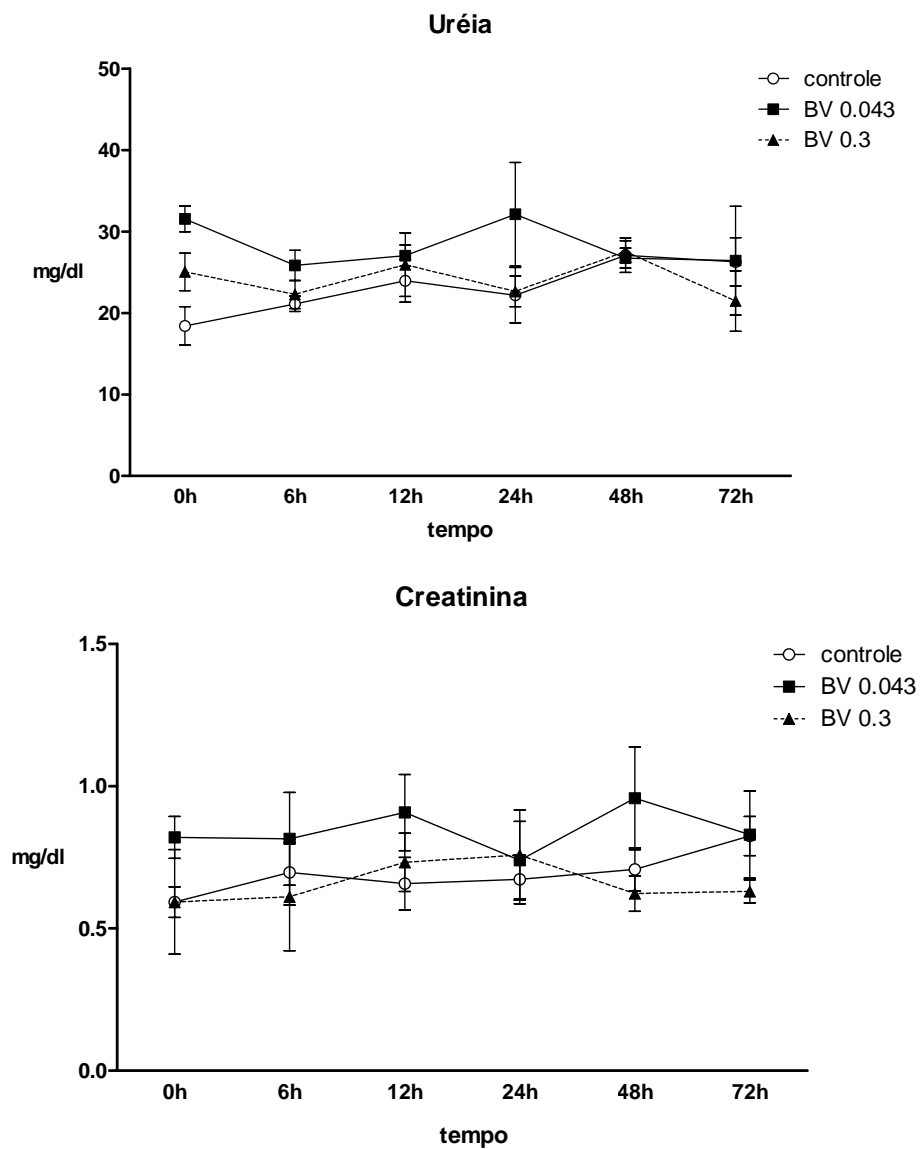


Figura 5: Análise dos níveis de uréia (A) e creatinina (B) após injeção de doses diluídas de veneno de abelhas (BV). 0,1ml de BV nas doses de 0,043mg de BV/animal (grupo BV 0,043; n=4) ou de 0,3mg de BV/animal (grupo BV 0,3; n=4) ou apenas salina (grupo controle; n=4) foram injetados no pavilhão auricular de cães Beagles. Dados apresentados como média \pm sem.

5. DISCUSSÃO

Doses diluídas de Veneno de abelha promovem reação cutânea local com o pico de 6h

Os resultados do presente estudo indicam que o veneno de abelhas inoculado no pavilhão auricular de cães promoveu reação inflamatória cutânea com um pico de 6 horas após a inoculação. A resposta cutânea local foi avaliada através de Teste de distensão tecidual em cães que mede a distensão tecidual associada ao processo inflamatório incitado pelo veneno. Compõem tal distensão tecidual o edema, resultante de aumento local de permeabilidade dos vasos da microcirculação e o acúmulo de células inflamatórias como consequência do fenômeno de quimiotaxia. Este teste cutâneo permite uma análise quantitativa através da mensuração do grau de distensão tecidual, e qualitativa pelo surgimento temporal do “tumor”. Dessa forma, tentou-se correlacionar as diferentes diluições de veneno à intensidade da reação cutânea.

Nossos resultados demonstraram a aplicação de 0,3mg/kg de BV produziu maior distensão tecidual relativa quando comparada ao controle, e que a diluição de 0,043mg/kg de BV/animal apresentou uma resposta intermediária não sendo estatisticamente diferente dos demais grupos. No entanto apesar da não significância na ANOVA, a diluição de 0,043mg/kg de BV/animal produziu uma reação cutânea considerável. Esta reação, muito provavelmente é capaz de produzir estimulação intensa e prolongada de nociceptores cutâneos. Quando aplicada em pontos de acupuntura, esta diluição poderá intensificar e prolongar o efeito da acupuntura. No entanto esta hipótese deve ser confirmada em estudos prévios.

Doses diluídas de Veneno de abelha não promove alterações clínicas e comportamentais

Nenhuma alteração comportamental de dor ou prurido intenso ou relacionada às reações de anafilaxia foram observadas neste estudo. Somente um animal do grupo 0,043mg apresentou prurido leve. O comportamento dócil e afável dos animais permaneceu inalterado durante todo o experimento. Prurido leve no local de aplicação foi notado apenas na primeira hora após a aplicação. O consumo hídrico e alimentar manteve-se inalterado. Nenhuma alteração clínica significativa foi observada durante o experimento, apenas variações fisiológicas de adaptação dos animais ao experimentador.

Estes dados sugerem que a aplicação de veneno de abelha nas diluições apresentadas não interfere nos parâmetros clínicos como pressão arterial, frequência cardíaca, além de não alterar a frequência respiratória e a temperatura corporal. No entanto podemos notar que a pressão arterial sofreu um declínio gradual com o tempo, dentro dos limites da normalidade provavelmente relativo à adaptação do animal ao protocolo experimental.

Doses diluídas de Veneno de abelha não promove alterações hematológicas

Os resultados do presente estudo demonstraram que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não promove qualquer alteração nos parâmetros hematológicos nas séries vermelha e branca em cães.

Em alguns parâmetros houve detecção de diferenças significativas nos parâmetros hematócrito e hemácias no fator tempo. No entanto como o teste pos-hoc de Bonferroni não detectou diferenças entre pares de grupos não consideramos que esta detecção de diferenças possua qualquer significado biológico.

Alguns animais incluídos neste experimento apresentaram parâmetros hematológicos basais abaixo da normalidade. Esta condição pode ter sido induzida por se tratarem de animais experimentais que são constantemente desafiados por situações de estresse. No entanto estes animais apresentavam condições clínicas normais e não apresentaram qualquer diferença nas reações ao veneno de abelha, ou seja a condição inicial destes animais não deve ter interferido nas respostas à doses diluídas de veneno. Outro fato importante é notar que em todos os grupos experimentais existiam animais com valores de hemograma abaixo da normalidade. Estes resultados indicam que doses diluídas de veneno não produziram qualquer alteração nos parâmetros hematológicos em cães.

Doses diluídas de Veneno de abelha não produz nefrotoxicidade

Os resultados do presente estudo demonstraram que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha não promove qualquer alteração nos parâmetros renais avaliados através da uréia e creatinina, indicando que o BV nas doses de 0,3mg/kg e 0,043mg/kg não produz nefrotoxicidade.

Os valores de uréia mantiveram-se normais durante o estudo. Apenas um animal do grupo BV 0,043 apresentou valores alterados nos tempos 6h (41,3mg/dl), 48h (42,4 mg/dl) e 72h (45,9 mg/dl), uma análise adicional foi realizada neste animal no tempo de 96h retornando ao valor de referência normal (31,64 mg/dl). Esta foi a alteração mais significativa deste estudo, indicando que com uma diluição certa podemos evitar os efeitos nefrotóxicos do veneno de abelha. Vale ressaltar que Grissoto e colaboradores observaram que uma única dose de 0,5mg/kg de BV em ratos é capaz de induzir insuficiência renal aguda (GRISOTTO et al., 2006).

Segurança de Doses diluídas de Veneno de abelha em cães

As diluições utilizadas demonstraram ser bastante seguras. A dose de 0,043mg de BV/animal (diluição de humanos corrigida para o peso do animal), que nos nossos animais significou por volta de 0,043mg/kg, e a diluição de 0,3mg de BV/animal (dose utilizada em humanos sem correção para o peso do animal), nos nossos animais por volta de 0,03mg/kg não produziram efeitos tóxicos. Vale lembrar que em veterinária como o peso do animal varia muito, devemos estar atentos para a utilização de BV em animais pequenos para que a dose (por kilo de animal) não exceda o 0,03mg/kg (maior dose avaliada neste estudo).

Recomendações no uso da apipuntura em cães

Apesar da segurança da diluição demonstrada neste estudo, algumas recomendações são importantes quanto a utilização da apipuntura.

1. Antes do início da aplicação deve ser realizado o teste alérgico.

O teste intradérmico é necessário como triagem dos animais que receberão a apipuntura. O preparo para este teste deve ser feito na região torácica lateral do animal, com tricotomia e limpeza do local com álcool 70%, três circunferências de aproximadamente

1,5cm são marcadas, numa delas será inoculado 0,05ml do controle negativo (solução salina), na outra será inoculado o igual volume do controle positivo (Sulfato de histamina 1:10000) e na outra igual volume de solução diluída de veneno de abelha 0,01µg/ml). Nos animais positivos é observado tumor e eritema no local de inoculação e a formação de erupção com diâmetro maior ou igual a metade do diâmetro dos controles positivo e negativo.

Não aplicar BV em animais com teste intradérmico para o BV positivo.

2. Cuidado com animais com histórico de atopia.

Um histórico bastante detalhado do animal, com informações sobre ocorrência de alergias e doenças dermatológicas. Animais atópicos estão relacionados a ter maior probabilidade de apresentarem reações anafiláticas ao BV.

3. Em todas as sessões de apipuntura devem ser consideradas as possíveis reações de anafilaxia.

Após a aplicação os animais devem ser acompanhados por pelo menos 1 hora, já que as reações de anafilaxia geralmente ocorrem nos primeiros minutos após o desafio alergênico. Após a primeira hora o risco de desenvolvimento de anafilaxia é mínimo. Além disso em todas as sessões, é necessária uma estrutura mínima de emergência, uma vez que mesmo que existe chance de que um animal que teve seu teste alérgico negativo, possa desenvolver reações alérgicas no futuro.

4. Consientização do proprietário.

A informação e consentimento do proprietário sobre o risco de anafilaxia e o tipo de estímulo tecidual produzido pelo BV é importante. Neste estudo a maior distensão tecidual ocorreu no período de 6h após inoculação, retornando a níveis basais no tempo de 72h.

6. CONCLUSÕES

Estes dados sugerem que a aplicação de doses diluídas de veneno de abelha 0,3mg de BV/animal e 0,043mgde BV/animal não interfere nos parâmetros clínicos de cães.

Nos dois tratamentos 0,3mg de BV/animal e 0,043mgde BV/animal, o grau de distensão tecidual apresentou um pico de 6h, retornando a níveis basais em 72h. Esta reação sugere um processo inflamatório local, no entanto como não foi realizado exame histológico do local de aplicação não foi possível identificar o tipo celular envolvido nesta reação, que não tem significado clínico relacionado a anafilaxia.

Apliação de doses diluídas de veneno de abelha 0,3mg de BV/animal e 0,043mgde BV/animal não promove alteração nos parâmetros hematológicos da série vermelha e da série branca, nem nos parâmetros bioquímicos de uréia e creatinina.

Estes dados demonstram que o uso de soluções diluídas de veneno de abelha nas doses utilizadas é bastante seguro para cães, no entanto a utilização de detalhado protocolo de triagem e teste intradérmico é necessário uma vez que não podemos descartar o risco de reações alérgicas em cães.

7. REFERÊNCIAS

- AMIN, ASHOK R.; ATTUR, MUKUNDAM; ABRAMSON STEVEN B. Nitric oxide synthase e cyclooxygenases: distribution, regulation, e intervention in arthritis. **Curr Opin Rheumatol** 11:202-209, 1999.
- BAEK YH, HUH JE, LEE JD, CHOI DO Y, PARK DS. Antinociceptive effect e the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by alpha2-Adrenoceptors. **Brain Res** 1073-1074:305-310, 2006.
- BECK,BF. The bible of bee venom therapy: bee venom,its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions. New York: Health Resources Press,1997-260p.
- BANKS BE, BROWN C, BURGESS GM, BURNSTOCK G, CLARET M, COCKS TM, JENKINSON DH. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. **Nature** 282:415-417, 1979.
- CERNANEC J, GUILAK F, WEINBERG JB, PISETSKY DS, FERMOR B Influence of hypoxia e reoxygenation on cytokine-induced production of proinflammatory mediators in articular cartilage. **Arthritis Rheum** 46:968-975, 2002.
- COWEEL AK, COWELLR. Manangement of bee e other Himenóptera sting. In: Kirks Veterinary Terapy XII: Small Aniamal Praticce (Bonaguar JD Kirk RW, eds) Philadelphia WD Saunders, 1995.
- DAHER,SILVIA; GALVÃO, CLOVIS; ABE AUGUSTO; COCCO, RENATA. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. Guia Prático de Alergia e Imunologia. Revista Brasileira de Alergia e Imunologia, vol 32 n°1, 2009.
- DRAEHMPAEL,D;ZOHMAM,A. Acupuntura no cão e no gato: princípios básicos e prática científica. São Paulo: Roca 1994.245p.
- FITZGERALD KT, FLOOD AA. Hymenoptera stings. **Clin Tech Small Anim Pract** 21:194-204, 2006.
- GOLDEN, DAVID B K; AGEY-SOBOTKA,ANNE; NORMAN, PHILLIP S.; HAMILTON,ROBERT G; LICHTENSTEIN,LAWRENCE M; Insect sting allergy with negative venom skin test responses. *J. Allergy Clin Immunology*, Mai 2001.
- GRISOTTO LSD, MENDES GE, CASTRO I, BAPTISTA MASF, ALVES VA, YU L, BURDMANN EA. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon** 48:44-54, 2006
- GUPTA P, GRAMMER LC. Administration of allergen vaccines. In: Allergens e allergen immunotherapy, 3rd Edition (Lockey RF, Bukantz SC, Bousquet J, eds), pp 481–493. New York: Marcel Dekker, Inc, 2004.
- GUPTA P, GREENBERGER PA Stinging insect allergy e venom immunotherapy. **Allergy Asthma Proc** 25:S9-10, 2004.
- HIDER RC, Honeybee venom: a rich source of pharmacologically active peptides. **Endeavour** 12:60-65, 1988.
- HOLLE L, SONG W, HOLLE E, WEI Y, WAGNER T, YU X. A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro e in vivo.**Int J Oncol** 22:93-98, 2003.
- HU H, CHEN D, LIU Y, DENG Y, YANG S, QIAO M, ZHAO J, ZHAO X. Target ability e therapy efficacy of immunoliposomes using a humanized antihepatoma disulfide-stabilized Fv fragment on tumor cells. **J Pharm Sci** 95:192-199, 2206a.
- HU H, CHEN D, LIU Y, DENG Y, YANG S, QIAO M, ZHAO J, ZHAO X. Preparation e targeted delivery of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled humanized anti-hepatoma disulfide-stabilized Fv (hdsFv25) in vitro. **Pharmazie** 61:685-688, 2206b.

- ICHINOSE M, MIURA M, TAKAHASHI T, YAMAUCHI H, KAGEYAMA N, TOMAKI M, ENDOH N, SAKURAI E, WATANABE T, SHIRATO K. Allergic airway response e potassium channels: histamine release e airway inflammation. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 17 Suppl C:36-39, 1995.
- JUNG JW, JEON EJ, KIM JW, CHOI JC, SHIN JW, KIM JY, PARK IW, CHOI BW. A FATAL CASE OF Intravascular Coagulation After Bee Sting Acupuncture. **Allergy Asthma Immunol Res.** 4(2): 107–109, 2012.
- JUNGDAE, KIM; KANG, DAE-IN; A Descriptive Statical Aproch the Korean Pharmacopuncture Terapy. *J. Acupunnture Meridian Stud* 2010; 3(3):141-149.
- KOBUROVA KL, MICHAILOVA SG, SHKENDEROV SV. Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin--bee venom polypeptide. **Acta Physiol Pharmacol Bulg** 11:50-55, 1985.
- KOO, EUN HIE; CHOI, SIK SANG; CHUNG, DONG HUN; LEE, OK II; KIM, NAN SOOK; LIM, SANG HOO. Mulpiple Psoas Abscess Formation After Farmacopuncture-A Case Report. *Korean J Pain.* December vol 23 n°4; 270-273, 2010.
- KWON YB, KANG MS, HAN HJ, BEITZ AJ, LEE JH. Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice: role of alpha(2) adrenoceptors. **Neurosci Lett** 308:133-137, .2001a.
- KWON YB, KIM JH, YOON JH, LEE JD, HAN HJ, MAR WC, BEITZ AJ, LEE JH. The analgesic efficacy of bee venom acupuncture for knee osteoarthritis: a comparative study with needle acupuncture. **Am J Chin Med** 29:187-199, 2001b.
- KWON YB, LEE JD, LEE HJ, HAN HJ, MAR WC, KANG SK, BEITZ AJ, LEE JH. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema e nociceptive responses. **Pain** 90:271-280, 2001c.
- KWON YB, KANG MS, KIM HW, HAM TW, YIM YK, JEONG SH, PARK DS, CHOI DY, HAN HJ, BEITZ AJ, LEE JH. Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation. **Acupunct Electrother Res** 26:59-68, 2001d
- KWON YB, LEE HJ, HAN HJ, MAR WC, KANG SK, YOON OB, BEITZ AJ, LEE JH. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive e anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. **Life Sci** 71:191-204, 2002.
- KWON YB, KIM HW, HAM TW, YOON SY, ROH DH, HAN HJ, BEITZ AJ, YANG IS, LEE JH. The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity. **J Neuroendocrinol** 15:93-96, 2003.
- KWON YB, HAM TW, KIM HW, ROH DH, YOON SY, HAN HJ, YANG IS, KIM KW, BEITZ AJ, LEE JH. Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha 2-adrenergic activity in mice. **Pharmacol Biochem Behav** 80:181-187, 2005.
- LARCHE M, AKDIS CA, VALENTA R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:761-771, 2006.
- LEE J-D, PARK H-J, CHAE Y, LIM S. An Overview of Bee Venom Acupuncture in the Treatment of Arthritis. **eCAM** 2:79-84, 2005
- LEE JH, KWON YB, HAN HJ, MAR WC, LEE HJ, YANG IS, BEITZ AJ, KANG SK. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive e anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. **J Vet Med Sci** 63:251-259, 2001.
- LEE MS, PITTLER MH, SHIN B-C, KONG JCL, ERNST E. Bee Venom Acupuncture for Musculoskeletal Pain: A Review. **J Pain** 9:289-297, 2008.
- LI B, GU W, ZHANG C, HUANG XQ, HAN KQ, LING CQ. Growth arrest e apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. **Onkologie** 29:367-371, 2006

- LUDOLPH-HAUSER D, RUEFF F, FRIES C, SCHOPF P, PRZYBILLA B. Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase e severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. **Lancet** 357:361-362, 2001.
- LUNA, SPL; XIE H; PREAST,VA. Acupuntura Veterinária Xie (2011), Medvet, xi, xiii, 2011.
- MACIOCIA, G. Os fundamentos da Medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fitoterapeutas, Roca,1,47.Cap 1 e 2, 1996.
- MOON DO, PARK SY, HEO MS, KIM KC, PARK C, KO WS, CHOI YH, KIM GY. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 e caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK e Akt. *Int Immunopharmacol* 6:1796-1807, 2006
- MULLER,GEORGE H., KIRK ROBERT W Dermatologia de Pequenos Animais. Interlivros 5ª Edição,448-569, 1996.
- MURAKAMI M, NAKATANI Y, ATSUMI G, INOUE K, KUDO I. Regulatory functions of phospholipase A2. **Crit Rev Immunol**17:225-283, 1997.
- NIE GJ, GOODIN AN, BRADEN TD, WENZEL JG. Luteal e clinical response following administration of dinoprost tromethamine or cloprostenol at standard intramuscular sites or at the lumbosacral acupuncture point in mares. **Am J Vet Res** 62:1285-1289, 2001.
- PARK HJ, SON DJ, LEE CW, CHOI MS, LEE US, SONG HS, LEE JM, HONG JT. Melittin inhibits inflammatory target gene expression e mediator generation via interaction with IkappaB kinase. **Biochem Pharmacol** 73:237-247, 2007.
- PARK HJ, LEE SH, SON DJ, OH KW, KIM KH, SONG HS, KIM GJ, OH GT, YOON DY, HONG JT. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF-kappaB through interaction with the p50 subunit. **Arthritis Rheum**50:3504-3515, 2004.
- PELLETIER JP, JOVANOVIC D, FERNANDES JC, MANNING P, CONNOR JR, CURRIE MG, DI BATTISTA JA, MARTEL-PELLETIER J. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Arthritis Rheum** 41:1275-1286, 1998.
- REISMAN RE. Allergy to stinging insects. In: Patterson's Allergic Diseases, 6th Edition (Grammer LC, Greenberger PA, eds), pp 225–237. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.
- RICHES KJ, GILLIS D, JAMES RA. An autopsy approach to bee sting-related deaths. **Pathology** 34:257-262, 2002.
- RINGLER, DOUGLAS J; Inflamação e Reparo; Cap 5 pag 119 a 165; Patologia Veterinária 6ª Edição.Editora Manole, 2000.
- ROH DH, KIM HW, YOON SY, KANG SY, KWON YB, CHO KH, HAN HJ, RYU YH, CHOI SM, LEE HJ, BEITZ AJ, LEE JH. Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents.**J Pain** 7:500-512, 2006.
- RUSSELL PJ, HEWISH D, CARTER T, STERLING-LEVIS K, OW K, HATTARKI M, DOUGHTY L, GUTHRIE R, SHAPIRA D, MOLLOY PL, WERKMEISTER JA, KORTT AA.Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro e in vivo studies. **Cancer Immunol Immunother** 53:411-421, 2004.
- SCHUMACHER MJ, EGEN NB. Significance of Africanized bees for public health. A review. **Arch Intern Med** 155:2038-2043, 1995.
- SHKENDEROV S, KOBUROVA K. Adolapin--a newly isolated analgetic e anti-inflammatory polypeptide from bee venom. **Toxicon** 20:317-321, 1982.

- SHUBA MF, VLADIMIROVA IA. Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to adenosine 5'-triphosphate e to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation. **Neuroscience** 5:853-859, 1980.
- SON D, LEE J, LEE Y, SONG H, LEE C, HONG J. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, e anti-cancer effects of bee venom e its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics** 115:246-270, 2007.
- SZABÓ, M P J; MORELI, J Jr; BECHARA, GH; Cutaneushipersensibility induced in dogs and guinea pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixididae) **Experimental and Applied Acarology**, 19(1995)723-730.
- VETTER RS, VISSCHER PK, Bites e stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol** 37:481-496, 1998.
- VETTER RS, VISSCHER PK, CAMAZINE S. Mass envenomations by honey bees e wasps. **West J Med** 170:223-227, 1999.
- VICK JA, SHIPMAN WH. Effects of whole bee venom e its fractions (apamin e melittin) on plasma cortisol levels in the dog. **Toxicon** 10:377-380, 1972.
- YANG Y, HUTCHINSON P, MORE EF. Inhibitory effect of annexin I on synovial inflammation in rat adjuvant arthritis. **Arthritis Rheum** 42:1538-1544, 1999.