

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**POTENCIAIS EFEITOS ANTIPSICÓTICO E
NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO SISTEMA
DOPAMINÉRGICO.**

CAMILA GOMES DANTAS

ARACAJU
Março – 2013

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**POTENCIAIS EFEITOS ANTIPSICÓTICO E
NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO SISTEMA
DOPAMINÉRGICO.**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de concentração em
Saúde e Ambiente.

CAMILA GOMES DANTAS

Orientadoras

Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.

Kátia Peres Gramacho, Ph.D.

ARACAJU
Março – 2013

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

D192p Dantas, Camila Gomes

Potenciais efeitos antipsicótico e neuroprotetor da apitoxina em modelos experimentais para estudo do sistema dopaminérgico. / Camila Gomes Dantas; Orientadores: Margarete Zanardo Gomes, Kátia Peres Gramacho. – Aracaju, 2013.

121p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação Mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1.Doença de parkinson. 2. Apis mellifera. 3. Melitina. I. Gomes, Margarete, Zanardo (orient.) II. Gramacho, Kátia Peres (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 504:614

**POTENCIAIS EFEITOS ANTIPSICÓTICO E NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO.**

Camila Gomes Dantas

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.
Orientadora

Kátia Peres Gramacho, Ph.D.
Orientadora

Murilo Marchioro, Ph.D.
1º Examinador

Edna Aragão Farias Cândido, Ph.D.
2º Examinadora

Waldecy de Lucca Júnior, Ph.D.
1º Suplente

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph.D.
2º Suplente

ARACAJU
Março – 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**, por me carregar em tuas mãos acolhedoras, onde permaneço segura, acalentada e fortalecida. Obrigada pela capacitação diária, em especial, durante a realização deste mestrado. A este Deus que sirvo, oferto ainda todo o meu amor, fidelidade e temor. Toda a minha confiança nos teus propósitos e a minha total dependência!

Aos meus pais (*in memoriam*), que dedicaram suas vidas em prol de suas filhas, transmitindo valores que jamais deixarei de pôr em prática. Vocês são a razão do meu viver, meus amores eternos. Sou infinitamente grata e a vocês dedico mais esta realização!

A minha irmã, **Natália Gomes Dantas**, por estar sempre ao meu lado, incentivando, aconselhando e tornando meus dias muito mais felizes.

Às minhas orientadoras, **Margarete Zanardo** e **Kátia Gramacho**, por me guiarem em novos caminhos do conhecimento.

Ao professor **Ricardo Albuquerque**, a quem admiro pelo exemplo de dedicação e competência que transmite diariamente.

À sociedade, para que num futuro próximo possa ser beneficiada, de forma mais incisiva, com possíveis terapias baseadas no produto natural pesquisado, a apitoxina.

“Até aqui nos ajudou o Senhor”

I Samuel 7:12

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo seu infinito amor que me sustenta a cada dia. Ratifico aqui a minha eterna gratidão pelo teu precioso cuidado e por permitir a vivência deste intenso diálogo, fortalecendo a minha fé e ensinando-me a olhar para as recompensas, porque diante dos desafios somente a tua presença já me basta, me fortalece. Obrigada pela oportunidade que me concedeu de vir ao mundo no seio de uma família regada de amor, cumplicidade e união.

Ao **meu saudoso pai**, sempre vivo no meu coração e em minhas memórias. Obrigada pela dedicação, zelo, ensinamentos e incentivos diários. Suas palavras e seus exemplos de força, comprometimento, firmeza e alegria serão guardados para sempre! Meu amor eterno!

À **minha mãe**, meu exemplo de vida, uma verdadeira facilitadora de sonhos, a quem tenho profunda admiração e infinitas saudades! Dizer “obrigada” é muito pouco, portanto à senhora, o meu comprometimento em seguir todos os seus ensinamentos, com dignidade, honra, respeito e retidão. Agradeço ainda pela total disponibilidade em sair de sua terra natal, e do seu estimado seio familiar, para embarcar comigo em outra realidade, rumo a uma nova vida em prol do meu crescimento intelectual e profissional. Por mais que cada um destes dias, desde a sua tão recente partida, estejam sendo de profunda dor e saudades, são os teus ensinamentos de raça, determinação, persistência e vivacidade que tem me sustentado e ajudado a seguir em frente, sem desistir dos objetivos mediante toda e qualquer dificuldade, entendendo que há tempo de chorar e tempo de agir.

Aos meus irmãos, em especial **Natália G. Dantas**, pessoa iluminada! Obrigada pelo seu cuidado, amor e compreensão. Nossos laços de união e amizade que já eram fortes, hoje se encontram firmemente atados. Que os olhos de Senhor estejam favoravelmente sobre nossas vidas e possamos seguir sempre em comunhão.

Aos meus **avós, familiares e amigos**, os meus agradecimentos pelo suporte e sentimentos dedicados a mim. Especialmente à **Paula Gomes**, por ter aberto as portas de sua casa em Aracaju para nos receber. Obrigada pelo carinho e amizade para conosco. À **Andréia Dantas**, grata pela força, solidariedade e por ter me apresentado a uma revigorante vivência de fé.

À **Prof^a. Dra. Margarete Zanardo**, que me recebeu nesta Instituição com respeito e atenção, desde o processo seletivo, e hoje é alvo de minha admiração pela sua postura e competência. Obrigada pela confiança, pelas experiências e conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade em ensinar os procedimentos experimentais e por ser sempre acessível e franca. À **Prof.^a Dra. Kátia Gramacho**, pela sua amizade, disponibilidade e alegria

contagante. Obrigada por compartilhar seu vasto conhecimento. Quando fala de suas adoráveis abelhas, exala amor pelos poros. É algo tão grandioso, que contagia! Não tem mais jeito, fui picada!

À **Prof^a. Dra. Juliana Cardoso**, pelas enormes contribuições, simpatia e ensinamentos e à **Prof^a. Dra. Edna Aragão**, sempre muito solícita e atenciosa. Obrigada pelo apoio e pelos valiosos acréscimos na banca examinadora de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz**, que com maestria coordena este programa de mestrado, transparente desde a seleção, servindo como exemplo de dedicação, não somente para nós, como também para tantos outros mestres e doutores. É admirável a forma como luta por todos os mestrandos envolvidos no programa, de modo que, lhe agradeço pela disponibilidade e pela sua crítica sempre enriquecedora. À vocês, meus sinceros respeito e gratidão por estarem contribuindo para meu crescimento profissional e pelo apoio e enorme compreensão mediante todas as circunstâncias.

Ao **Prof. Dr. Waldecy de Lucca**, por ter disponibilizado as dependências de seu laboratório na Universidade Federal de Sergipe para a realização das cirurgias estereotáxicas e aos funcionários da Universidade Tiradentes, que diariamente trabalham em prol do corpo discente. Em especial: **Tháise** (coordenação), **Gladiston, Max e Marcos** (biotério) e **Dona Fátima** (serviços gerais), sempre acessíveis e dispostos a ajudar.

À grande amiga **Louliane Gomes**, pelo apoio essencial, e às queridíssimas parceiras e amigas que o mestrado em saúde e ambiente me proporcionou conhecer, em especial: **Tássia Nunes, Tâmara Nunes, Ailma Paixão, Rafaela Oliveira, Fany Moraes, Sheila Barroso, Nely Pereira, Andréia Poschi, Jamile Santana e Catharina Grace**. Muito obrigada pelo apoio, carinho, conforto e dedicação. Sem vocês ao lado, parte disto não seria possível.

À **FAPITEC**, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xiii
INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1 Fisiologia dos núcleos da base	22
1.2 Doença de Parkinson.....	25
1.3 Modelos experimentais para estudo da doença de Parkinson.....	32
1.4 Produtos naturais.....	35
1.5 Apicultura.....	37
1.6 Apicultura e meio ambiente.....	41
1.7 Espécie: <i>Apis mellifera</i>	42
1.8 Apiterapia	45
1.9 Apitoxina.....	47
1.9.1 Ação da apitoxina na membrana celular	50
1.9.2 Efeitos da apitoxina no Sistema Nervoso Central.....	52
2. REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO II.....	75
EFEITOS DA APITOXINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS	76
RESUMO.....	77
ABSTRACT	78
INTRODUÇÃO.....	79
MATERIAL E MÉTODOS	81
RESULTADOS	84
DISCUSSÃO	88

CONCLUSÕES.....	90
REFERENCIAS	91
CAPÍTULO III.....	95
AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON.....	96
RESUMO	97
ABSTRACT	98
INTRODUÇÃO.....	99
MATERIAL E MÉTODOS	101
RESULTADOS	105
DISCUSSÃO	108
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS	112
CONCLUSÃO GERAL	119
ANEXOS.....	120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Pg.

Tabela 1: Efeitos da apitoxina no teste de catalepsia em camundongos 84

Tabela 2: Efeitos da apitoxina no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos 88

CAPÍTULO III

Tabela 1: Resultados do teste de comportamento rotatório 107

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pg.

Figura 1: Corte coronal do cérebro, mostrando os principais núcleos basais. Córtex (C); Estriado (STR); Globo pálido externo (GPe); Globo pálido interno (GPi); Tálamo (Th); Núcleo subtalâmico (STN); Substância negra parte compacta (SNc); Substância negra parte reticulada (SNr)..... 22

Figura 2: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base. Em a) o funcionamento em indivíduos normais, em b) funcionamento em indivíduos com DP. A espessura das setas indica a intensidade de sinal transmitido pela sinapse, mostrando o desequilíbrio provocado pela falta de dopamina no paciente parkinsoniano. Substância negra compacta e reticular (SNc e SNr); Globo pálido externo e interno (GPe e GPi), núcleo subtalâmico (STN), Núcleo pedúnculo pontino (PPN) e Núcleo ventro-lateral (VL)..... 25

Figura 3: Neuropatologia da doença de Parkinson. (a) representação esquemática da via nigroestriatal normal. (b) na DP e (c) imuno-histoquímica marcando inclusões intracelulares os chamados corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNc..... 26

Figura 4: Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno. É possível visualizar o sistema motor composto por grupos musculares associados a três pares de placas quitinosas localizadas internamente. 44

CAPÍTULO II

Figure 1: Efeitos da apitoxina e do haloperidol no teste de campo aberto no que se refere aos comportamentos de exploração horizontal (A) e exploração vertical (B). O teste foi realizado 30 min após injeção subcutânea (s.c.) de apitoxina (0,1 e 1,2 mg/kg), salina (40 µl) ou haloperidol (0,2 mg/kg). Ambos, apitoxina e haloperidol, promoveram redução do número de explorações horizontais e verticais, e o pré-tratamento com haloperidol modificou os efeitos da apitoxina (1,2 mg/kg). As barras representam as médias $\pm$ erro padrão da média dos comportamentos, que foram expressos em 5 min. #: diferença significativa em relação aos outros grupos, exceto haloperidol [$p < 0,0001$ comparado com salina e apitoxina (0,1 mg/kg), $p = 0,001$ comparado com apitoxina (0,1 mg/kg/haloperidol), e $p = 0,018$ comparado a apitoxina (1,2 mg/kg/haloperidol)]. +: diferença significativa em relação aos outros grupos e apitoxina (1,2 mg/kg) + haloperidol [$p = 0,001$ comparado com salina; $p = 0,014$ comparado a apitoxina (0,1 mg/kg), e $p = 0,019$ comparado a apitoxina (1,2 mg/kg/haloperidol)]. * Indica diferença significativa quando comparado com todos os outros grupos. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, $n = 5$).... 86

Figure 2: Tratamento agudo com apitoxina [0.1 mg/kg (preto) e 1.2 mg/kg (cinza)] na redução do comportamento de estereotipias induzidas por apomorfina em camundongos.

Apitoxina ou salina (40 µl, coluna branca) foi administrada 30 min antes da apomorfina (20 mg/kg, s.c.), e as medidas foram feitas por 10 s em intervalos de 10 min durante 60 min. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média no tempo de 10 s. * indica as diferenças em relação ao grupo salina (ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey post-test, n = 4-5)..... 87

CAPÍTULO III

Pg.

Figura 1: Arena para realização do teste de campo aberto..... 104

Figura 2: Visualização do teste de comportamento rotatório..... 105

Figura 3: Resultados do parâmetro de exploração horizontal no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações horizontais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas: “a” diferente de “b” e “c” ($p < 0,05$); “b” diferente de “a” ($p < 0,001$); “b’ ” diferente de “a” ($p < 0,05$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Duncan..... 106

Figura 4: Resultados do parâmetro de exploração vertical no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações verticais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas: “b” diferente de “a” ($p < 0,05$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Duncan..... 107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

6-OHDA: 6 - Hidroxidopamina
CL: Corpúsculos de Lewy
COMT: Catecol-o-metil transferase
COX: Enzima cicloxigenase
DA: Neurônios dopaminérgicos
DAT: Transportador de dopamina
DP: Doença de Parkinson
ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica
EM: Esclerose Múltipla
ERO's: Espécies reativas de oxigênio
ERN's: Espécies reativas de nitrogênio
GABA: Ácido Gama-aminobutírico
GPe: Globo Pálido externo
GPi: Globo Pálido interno
IL: Interleucina
iNOS: Sintase de óxido nítrico induzida
L-DOPA: 3,4-diidroxifenilalanina
MAC-1: Antígeno de Macrófagos Complexo-1
MCD: Peptídeo degranulador de mastócitos
MPP⁺: 1-metil-4-fenilpitidínio
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NB: Núcleos Basais
NO: Óxido Nítrico
NOS: Sintase de óxido nítrico
PLA₂: Fosfolipase A₂
PPN: Núcleo Pedúnculo Pontino
PQ: Paraquat
SNC: Sistema Nervoso Central
SNc: Substância negra parte compacta
SNr: Substância Negra parte reticular
STN: Núcleo subtalâmico
STR: Estriado
Th: Tálamo

TH: Tirosina Hidroxilase

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VMAT: Transportador vesicular de monoaminas

POTENCIAIS EFEITOS ANTIPSICÓTICO E NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Camila Gomes Dantas

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas do gênero *Apis* e apresenta efeitos neuroprotetor e antiinflamatório. No presente trabalho, objetivou-se analisar os efeitos farmacológicos da apitoxina sobre o sistema nervoso central em roedores e avaliar o possível efeito neuroprotetor da apitoxina em modelo experimental da doença de Parkinson (DP). A análise farmacológica foi realizada, por meio de testes de comportamento, com particular ênfase para o sistema dopaminérgico. Para tanto, 35 camundongos foram divididos em sete grupos que receberam: salina; apitoxina (0,1 mg/Kg); apitoxina (1,2 mg/Kg); haloperidol (0,2 mg/kg); haloperidol/apitoxina 0,1 mg/Kg; haloperidol/apitoxina 1,2 mg/Kg e diazepam (1 mg/Kg). Foram realizados os testes de catalepsia, campo aberto, estereotipias induzidas por apomorfina e labirinto em cruz elevado. Os resultados dos testes foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey para comparações entre os tratamentos. A apitoxina na dose de 1,2 mg/kg reduziu a atividade motora ($p < 0,0001$), as estereotipias induzidas por apomorfina ($p = 0,032$) e promoveu efeito cataléptico, de maneira análoga ao haloperidol ($p = 0,04$). Estes efeitos foram diminuídos pelo pré-tratamento com haloperidol, sugerindo ação antipsicótica da apitoxina e interação com o sistema dopaminérgico. Em adição, o efeito do tratamento da apitoxina, e seu principal componente, melitina, foi observado na progressão da morte neuronal dopaminérgica após aplicação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), modelo experimental da DP. Para tanto, 45 camundongos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para micro-injeção intra estriatal da neurotoxina 6-OHDA (4 μ l, 6 mg/ μ l) ou do veículo. A apitoxina (0,1; 0,6 e 1,2 mg/kg) e a melitina (0,2 mg/kg) foram administradas durante três semanas consecutivas à cirurgia, uma vez a cada dois dias. Os animais foram submetidos aos testes de campo aberto e comportamento rotatório 30 dias após a lesão. As diferenças entre os tratamentos foram analisadas através do ANOVA, seguido do pós-teste de Duncan, ($p < 0,05$). Observou-se que o tratamento com apitoxina (0,1 mg/kg) reverteu os déficits motores observados no campo aberto em relação ao grupo 6-OHDA e ainda diminuiu o número médio de rotações induzidas por apomorfina (6-OHDA/salina = 70, 6-OHDA/apitoxina 0,1 mg/kg = 0). Por outro lado, a melitina aumentou o número médio de giros (348). Os resultados sugerem um efeito neuroprotetor da apitoxina e apontam uma possível toxicidade pela administração isolada da melitina no modelo experimental da DP.

Palavras-chave: doença de Parkinson; *Apis mellifera* e melitina.

POTENTIAL ANTIPSYCHOTIC AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF THE BEE VENOM ON THE DOPAMINERGIC SYSTEM IN MICE.

Camila Gomes Dantas

The apitoxin is the bee venom produced *Apis mellifera* which presents neuroprotective and anti-inflammatory effects. The aims of this work were to evaluate the pharmacological effects of the bee venom on the central nervous system in rodents and evaluate its neuroprotective in an experimental model of Parkinson's disease (PD). The pharmacological analysis was performed by testing behavior, with particular emphasis on the dopaminergic system. For this purpose, 35 mice were divided into seven groups receiving: saline, apitoxin (0.1 mg / kg), bee venom (1.2 mg / kg), haloperidol (0.2 mg / kg), haloperidol / apitoxin 0, 1 mg / kg, haloperidol / apitoxin 1.2 mg / kg and diazepam (1 mg / Kg). The catalepsy, open field, stereotypies induced by apomorphine and elevated plus maze test were performed 30 minutes after treatments. Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-test ($p < 0.05$), factor being treatment. The bee venom in a dose of 1.2 mg / kg reduced the motor activity ($p < 0.0001$), the stereotypies induced by apomorphine ($p = 0.032$) and promoted cataleptic effect, in a similar manner to haloperidol ($p = 0.04$). These effects decreased by the pretreatment with haloperidol, suggesting antipsychotic action of bee venom and interaction with the dopaminergic system. In addition, it was analyzed the effect of apitoxin, and its main component, the melittin, on mice behavior after 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced progressive dopaminergic neuronal loss, an experimental model of PD. Mice (45) received intra striatal microinjection of the neurotoxin 6-OHDA (4 μ l, 6 mg / μ l) or vehicle. Bee venom (0.1, 0.6 and 1.2 mg / kg) and melittin (0.2 mg/Kg) were administered for three weeks, once every two days, and the open field and rotational behavior tests were performed 30 days after surgery. Differences between treatments were assessed by ANOVA followed by Duncan's post-test ($p < 0.05$). It was observed that treatment with bee venom (0.1 mg / kg) reversed the motor deficits observed in open field when compared to 6-OHDA group and also decreased the average number of apomorphine-induced rotations (6-OHDA/salina = 70 and 6-OHDA / apitoxin 0.1 mg / kg = 0). Furthermore, melittin increased the mean number of turns (348). These results suggest a neuroprotective effect of the bee venom and a possible toxic effect of melittin in the experimental model of PD.

Keywords: Parkinson's disease; *Apis mellifera* and melitin.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Compostos orgânicos provenientes de plantas, de organismos marinhos e terrestres, vertebrados e invertebrados, foram utilizados extensivamente no passado e ainda no presente tornaram-se imprescindíveis para a terapêutica de diversas doenças, pois constituem novas entidades químicas com larga diversidade estrutural (RATCLIFFE *et al.*, 2011; BUTLER; NEWMAN, 2008; CHIN *et al.*, 2006). Nesse sentido, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na clínica moderna foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, onde 25% derivaram de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CHIN *et al.*, 2006; CALIXTO, 2003).

Dentre as espécies que compõem o reino animal, é mister salientar a relevante contribuição das abelhas em prol da saúde humana, pois o emprego dos produtos apícolas para finalidades terapêuticas remonta a antiguidade (RATCLIFFE *et al.*, 2011). Os efeitos biológicos da própolis (RIGHI *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2009; AWALE *et al.*, 2008), mel, pólen e geléia real (RATCLIFFE *et al.*, 2011; CHEN; LARIVIERE, 2010) já foram amplamente discutidos na literatura, de modo que o veneno das abelhas e sua composição têm despertado o crescente interesse da comunidade científica.

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas e consiste numa mistura complexa de enzimas (KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988), peptídeos (MATYSIAK, 2011; KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988) e aminoácidos (ZHOU *et al.*, 2010; HIDER, 1988), além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios (HIDER, 1988). Dentre os componentes da apitoxina produzida por abelhas do gênero *Apis*, destaca-se a melitina, que representa 50% do peso seco do veneno (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988) e apresenta importante propriedade antiinflamatória (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), potente atividade antibacteriana e antifúngica (ORŠOLIĆ, 2011) e largo espectro de ação (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010; BOGAART *et al.*, 2008).

A terapia com apitoxina em estudos experimentais tem revelado propriedades antiinflamatória (LEE *et al.*, 2010a; MOON *et al.*, 2007; SON *et al.*, 2007; ZURIER *et al.*, 1973), anti-nociceptiva (ROH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2003), anti-aterogênica (LEE *et al.*, 2010a), cicatrizante (HAN *et al.*, 2011), anti-tumoral (ORŠOLIĆ, 2011; SON *et al.*, 2007) e hepatoprotetora (PARK *et al.*, 2010). Adicionalmente, a apitoxina tem apresentado potencial terapêutico significativo inclusive para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (LEE *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010).

Recentemente, estudos experimentais com o modelo agudo de lesão para o estudo da doença de Parkinson também têm relatado possíveis efeitos positivos da apitoxina sobre a morte de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (CHUNG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011a; DOO *et al.*, 2010), contudo, um dos fatores que confere caráter inédito ao presente estudo consiste na avaliação da apitoxina sobre um modelo progressivo para estudo desta doença, que se assemelha a sua evolução em humanos.

Deste modo, a compreensão inicial dos efeitos farmacológicos após a administração de diferentes concentrações da apitoxina sobre o sistema nervoso central, em condições fisiológicas, também se faz necessária, pois possibilitará o conhecimento aprofundado dos mecanismos de ação desta substância no que se refere a condições motoras, emocionais e cognitivas, sugerindo assim novas abordagens terapêuticas para distúrbios mentais. Tais análises possibilitarão maior conhecimento acerca deste produto e sobretudo, estima-se que a extração do veneno de abelhas para fins terapêuticos fortalecerá a apicultura no estado de Sergipe, valorizando o desenvolvimento regional e favorecendo a fixação do homem no campo, injetando na economia uma nova vertente para os apicultores por meio da exploração de mais um produto, gerando emprego, renda e melhor qualidade de vida.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração da apitoxina e da melitina sobre o sistema nervoso central e suas interações com a neurotransmissão dopaminérgica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar os efeitos farmacológicos da administração de apitoxina, por meio de testes de comportamento em roedores;
- Avaliar o possível efeito neuroprotetor da apitoxina e da melitina na progressão da morte neuronal após aplicação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em camundongos, por meio da avaliação funcional;
- Comparar os efeitos promovidos pelo veneno e pela melitina, quando administrados de forma isolada.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Fisiologia dos Núcleos da Base

Os núcleos da base constituem um conjunto de corpos celulares subcorticais interconectados, que desempenham importante papel no controle das atividades motora, cognitiva e emocional (OBESO *et al.*, 2008a,b; NAMBU, 2008; ROUSE *et al.*, 2000). Seus principais componentes são os núcleos: putâmen, caudado, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra (FUGYAMA, 2009; KOPRICH *et al.*, 2009; OBESO *et al.*, 2002).

Os núcleos putâmen e caudado apresentam a mesma origem embriológica e conexões semelhantes, de modo que podem ser representados como uma unidade funcional denominada núcleo estriado dorsal. O complexo estriado compreende também o núcleo accumbens. O estriado juntamente com o globo pálido, que divide-se em partes interna e externa, localizam-se lateralmente ao tálamo e são separados pela cápsula interna (WICHMANN; DOSTROVSKY, 2011; OBESO *et al.*, 2008a). Já o núcleo subtalâmico localiza-se no diencéfalo e a substância negra, composta pela parte compacta (dorsal) e parte reticulada (ventral), localiza-se no mesencéfalo (FUGYAMA, 2009; OBESO *et al.*, 2002), conforme a Figura 1.

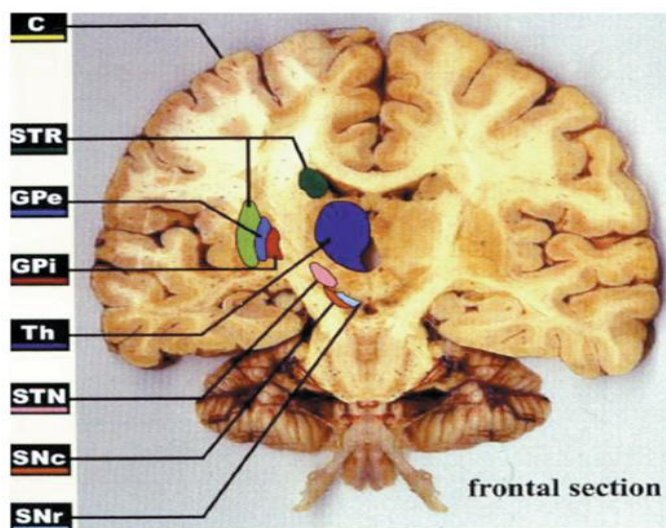


Figura 1. Corte coronal do cérebro, mostrando os principais núcleos basais. Córtex (C); Estriado (STR); Globo pálido externo (GPe); Globo pálido interno (GPi); Tálamo (Th); Núcleo subtalâmico (STN); Substância negra parte compacta (SNc); Substância negra parte reticulada (SNr). Fonte: OBESO *et al.*, 2002.

Ao contrário da maioria dos componentes que formam o sistema que controla os movimentos, os gânglios da base não se conectam diretamente com os neurônios motores

medulares, mas apresentam uma estreita relação com o córtex cerebral (NAMBU, 2008), interagindo funcionalmente por meio de uma alça de retro-alimentação, o que permite desta forma o controle motor, como é possível visualizar a seguir, na Figura 2. Neste contexto, inúmeras aferências, motoras e sensitivas, provenientes de múltiplas áreas corticais chegam aos núcleos da base por meio do estriado, estabelecendo conexões sinápticas excitatórias glutamatérgicas com neurônios espinhosos médios, de acordo com o exposto por Wichmann e DeLong (2003).

Esses neurônios dão origem a duas vias de saída para o tálamo: a via direta e a via indireta. A via direta conecta diretamente o estriado aos núcleos de saída (Globo Pálido interno e Substância Negra reticulada). Nesta via, os neurônios que saem do estriado liberam o neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) e o neuropeptídeo substância P e dinorfina, que vão inibir os neurônios GABAérgicos localizados no Globo Pálido interno e na parte reticulada da Substância Negra. Estes núcleos de saída reduzem sua ação inibitória sobre o tálamo, que uma vez desinibido, estimula as áreas corticais e facilita a realização do movimento (DELONG; WICHMANN, 2009; KOPRICH *et al.*, 2009; NAMBU, 2008; ROUSE *et al.*, 2000).

Já a via indireta inicia-se nas projeções GABAérgicas (neurônios GABAérgicos que contém encefalina e neurotensina), que vão do estriado ao globo pálido externo, seguindo para o núcleo subtalâmico. Por conseguinte, o núcleo subtalâmico ativa os núcleos de saída por meio da liberação de glutamato que excita os neurônios GABAérgicos e estes inibem as células tálamocorticais, impedindo a facilitação do movimento. Em seguida as eferências são projetadas para áreas específicas do córtex cerebral, a citar área pré-motora e área motora suplementar, regiões relacionadas ao processamento de funções superiores no controle do movimento, refletindo diretamente na iniciação do mesmo (WICHMANN; DOSTROVSKY, 2011; KOPRICH *et al.*, 2009; OBESO *et al.*, 2008a,b; NAMBU, 2008; BEDIN; FERRAZ, 2003; DELONG, 1990).

O estriado recebe ainda outra aferência por meio de uma projeção de extrema importância: a via dopaminérgica nigro-estriatal. Essa projeção se inicia nos neurônios da substância negra parte compacta e termina diretamente nos espinhos dos dendritos dos neurônios de projeção médios que compõem o estriado, de maneira que esta via é capaz de regular o afluxo de informações corticais que chegam aos neurônios de projeção no estriado. Assim, a via nigro-estriatal é capaz de modular a atividade das vias direta e indireta em virtude do neurotransmissor dopamina, proveniente do mesencéfalo, cuja projeção principal é o núcleo estriado, que age de forma excitatória aos neurônios que vão formar a via direta, ligando-se a receptores do tipo D1 acoplados a proteínas G que aumentam a atividade celular e atuam de forma inibitória aos neurônios que vão formar a via indireta, ligando-se aos receptores do tipo D2 acoplados a proteínas G que diminuem a atividade

celular (KOPRICH *et al.*, 2009; GALVAN; WICHMANN, 2008). Deste modo, fisiologicamente, a via nigro-estriatal age facilitando o movimento já que ela ativa a via direta e inibe a via indireta (OBESO *et al.*, 2000a,b; DELONG, 1990).

Compreende-se assim, que a neurotransmissão nos núcleos da base é complexa, porém, que a dopamina tem papel primordial no controle desta circuitaria (WICHMANN; DOSTROVSKY, 2011; OBESO *et al.*, 2008a,b). Alterações dos níveis de dopamina em qualquer um dos principais sistemas dopaminérgicos centrais, como as vias mesolímbica, mesocortical, túbero-infundibular e nigro-estriatal, acarretarão em importantes repercussões.

No que se refere a disposição anatômica destas vias dopaminérgicas, as vias mesolímbica e mesocortical se originam na área tegmentar ventral do mesencéfalo. A via mesolímbica se projeta em direção a componentes do sistema límbico, como o núcleo *acumbens*, hipocampo e amígdala, e a via mesocortical tem suas terminações sinápticas localizadas no córtex pré-frontal. A via nigro-estriatal parte da substância negra compacta em direção ao núcleo estriado e a via túbero-infundibular é compreendida entre o núcleo arqueado do hipotálamo e a glândula pituitária (ABI-DARGHAM; LARUELLE, 2005; ABI-DARGHAM, 2004). Estima-se que os sistemas dopaminérgicos mesocortical e mesolímbico estejam diretamente envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia, transtorno psíquico severo caracterizado por dois ou mais sintomas, como alterações visuais, auditivas, delírios e sintomas depressivos (GUILLIN; ABI-DARGHAM; LARUELLE, 2007; GOTO; GRACE, 2007).

A hipótese dopaminérgica clássica desta enfermidade aponta que os sintomas positivos sejam secundários a uma hiperatividade dopaminérgica subcortical ou, mais precisamente, mediados pelos receptores dopaminérgico do tipo D2 da via mesolímbica (GOTO; GRACE, 2007; ABI-DARGHAM; LARUELLE, 2005; ABI-DARGHAM, 2004; ABI-DARGHAM *et al.*, 2000). Adicionalmente, é atribuído a esta hipótese um déficit de atividade da via mesocortical, ou, especificamente, uma hipoatividade do receptor dopaminérgico do tipo D1 no córtex pré-frontal, que estaria relacionado com os sintomas negativos e cognitivos da doença (GUILLIN; ABI-DARGHAM; LARUELLE, 2007; GOTO; GRACE, 2007).

A via túbero-infundibular relaciona-se a regulação da liberação de hormônios e a via nigro-estriatal, conforme mencionada anteriormente de forma minuciosa, relaciona-se a coordenação sensório-motora e a iniciação do movimento. Deste modo, uma disfunção em qualquer estrutura ou neurotransmissor que participa do sistema dopaminérgico, a exemplo da doença de Parkinson, onde há depleção da dopamina na via nigro-estriatal, acarretará não somente em importantes repercussões motoras (OBESO *et al.*, 2000a,b; DELONG, 1990), mas também em alterações cognitivas e/ou emocionais.

1.2 Doença de Parkinson (DP)

Descrita pela primeira vez em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, a enfermidade foi nomeada como Paralisia Agitante em virtude do desenvolvimento da doença, que ao final de aproximadamente dez anos determinava o acamamento do paciente que, apesar da paralisia, exibia tremor intenso e rítmico predominantemente nos membros superiores e essencialmente em mão esquerda (CHAUDHURI *et al.*, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Deste modo, no intuito de homenagear James Parkinson, a literatura médica consagrou a enfermidade como doença de Parkinson (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; SAMII; NUTT; RANSOM, 2004).

Considerada uma doença neurodegenerativa progressiva e incapacitante (CHUNG *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009; GALTER, 2008) e identificada neste contexto como a segunda mais freqüente depois da doença de Alzheimer (CHO *et al.*, 2012; WIRDEFELDT *et al.*, 2011; MUANGPAISAN *et al.*, 2011; SHAPIRA *et al.*, 2009; LAU; BRETELER, 2006), a DP é caracterizada pela perda contínua (maior que 80%) de neurônios dopaminérgicos (DA) na parte compacta da substância negra, implicando na diminuição de dopamina na via nigro-estriatal (CHUNG *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2012; WICHMANN; DOSTROVSKY, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RIZELIO *et al.*, 2010; LANE; DUNNETT, 2008; LEW, 2007; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS *et al.*, 2002). Como resultado, obtém-se uma redução da atividade de neurônios estriatais de projeção que formam a via direta e um aumento na atividade dos que formam a via indireta (Figura 2), gerando as hipocinesias características da enfermidade (RIZELIO *et al.*, 2010; CENTONZE *et al.*, 2005).

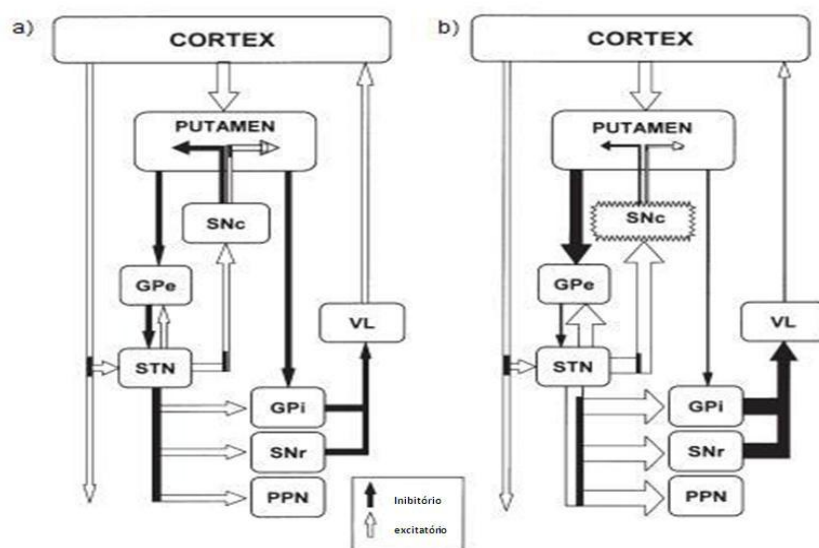


Figura 2. Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base. Em a) o funcionamento em indivíduos normais, em b) funcionamento em indivíduos com DP. A

espessura das setas indica a intensidade de sinal transmitido pela sinapse, mostrando o desequilíbrio provocado pela falta de dopamina no paciente parkinsoniano. Substância negra compacta e reticulada (SNc e SNr); Globo pálido externo e interno (GPe e GPi), núcleo subtalâmico (STN), Núcleo pedúnculo pontino (PPN) e Núcleo ventro-lateral do tálamo (VL). Fonte: OBESO *et al.*, 2002.

Outra característica encontrada em pacientes com DP é a presença de inclusões citoplasmáticas neuronais, denominadas corpos de Lewy, em alguns neurônios dopaminérgicos sobreviventes. Estas estruturas representam a particularidade neuropatológica mais importante da DP e são caracterizadas pela presença de agregados protéicos, com 15 µm de diâmetro e organização estrutural de densidade hialina, compostos por: parkina, ubiquitina, neurofilamentos e pela proteína α -sinucleína (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2010; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). (Figura 3)

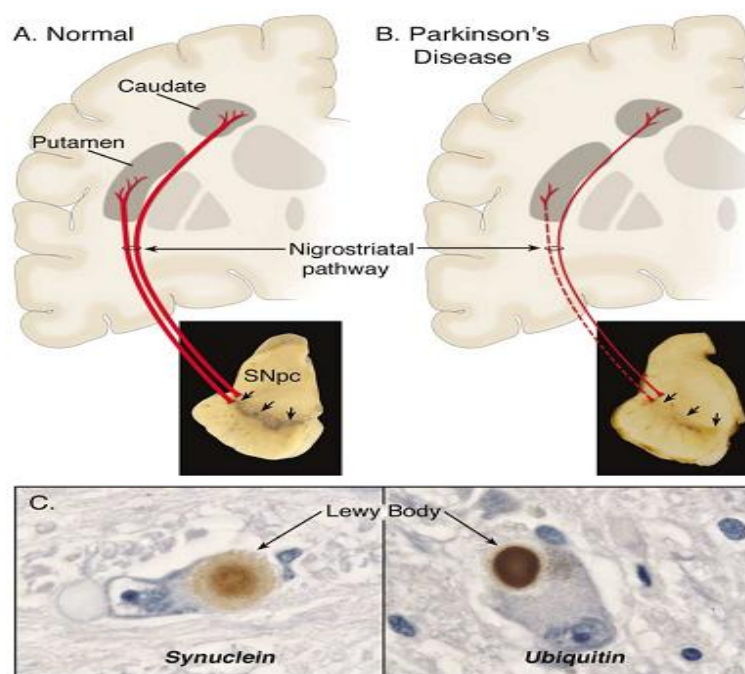


Figura 3. Neuropatologia da doença de Parkinson. (a) representação esquemática da via nigroestriatal normal. (b) na DP e (c) imuno-histoquímica marcando inclusões intracelulares os chamados corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNc. Fonte: DAUER; PRZEDBORSKI, 2003.

Estudos descritivos epidemiológicos têm sido realizados em todo o mundo a fim de estimar a prevalência e incidência da DP. Contudo, as alternâncias metodológicas e os critérios diagnósticos diferenciados, contribuem para as diferenças existentes de relatos no que se refere aos dados desta enfermidade (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; MUANGPAISAN *et al.*, 2011; LAU; BRETELER, 2006). Neste sentido, Wirdefeldt *et al.* (2011), relataram dados da prevalência mundial da DP em 2005, entre pessoas acima de 50 anos de idade, de 4,1 e

4,6 milhões de indivíduos. Ainda segundo estes autores, estima-se que até o ano de 2030, a incidência da doença seja de 8,7 a 9,3 milhões de casos no mundo.

Adicionalmente, Muangpaisan et al. (2011), atribuíram as variações nas estimativas de sua pesquisa, às formas de obtenção de dados para os registros epidemiológicos e a alta expectativa de vida de determinados países. Conforme o estudo, a prevalência da DP, com base em dados epidemiológicos de registros hospitalares, mostrou que a idade específica de indivíduos acometidos variou entre 70 e 79 anos em Manhatann, nos Estados Unidos, e oscilou entre 80 e 89 anos em países como Escócia, Reino Unido e Itália (nas localidades de Ferrara e Sicília). No Japão, a prevalência da DP mostrou o acometimento de indivíduos acima de 90 anos de idade.

Wirdefeldt et al. (2011) apontaram dados que relataram menor prevalência da DP na África, Ásia e América do Sul, em comparação com a Europa. Segundo os autores, os dados de prevalência no Brasil foram de 3.300 casos a cada 100.000 habitantes com idade acima de 65 anos. A prevalência da DP mostrou-se crescente e de forma notável também entre indivíduos de 80 a 89 anos de idade no país (MUANGPAISAN *et al.*, 2011).

A incidência mundial da DP aumenta claramente após os 60 anos de idade, de acordo com Wirdefeldt et al. (2011). No estudo de Muangpaisan et al. (2011), a idade específica de indivíduos com a enfermidade variou entre 60 e 79 anos em Singapura, 70 e 79 anos nos Estados Unidos, Suécia e Londres e tem acometido pessoas acima de 90 anos na Noruega e no Hawaii, de maneira que a incidência da média de idade de início dos sintomas da DP foi de 62 a 70 anos, mostrando-se raro antes dos 50 anos de idade e com pico de incidência entre 70 a 79 anos. Adicionalmente, não foram encontrados relatos a cerca da incidência da DP no Brasil.

A prevalência desta enfermidade foi apontada como maior em homens que em mulheres, conforme Wirdefeldt et al. (2011), Haaxma et al. (2007) e Lau e Breteler (2006). A maior frequência de intensidade a exposição a toxinas ocupacionais em indivíduos do gênero masculino e possíveis efeitos protetores do estrôgenio aparecem para justificar este dado (WIRDEFELDT *et al.*, 2011). De acordo com Lau e Breteler (2006) este hormônio feminino possivelmente apresenta propriedade antioxidante, conforme estudos experimentais e em humanos, contudo ainda há controvérsias sobre o assunto.

No que se refere a etiologia da DP, a mesma ainda não é completamente definida (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; LEW, 2007), contudo a patogênese da doença começou a ser compreendida mediante estudos *post-mortem*, por meio de análises de cérebros de pacientes afetados, trabalhos em cultura de células e através de modelos animais (MILLER *et al.*, 2009). Estudos indicam que a DP apresenta origem multifatorial e apontam efeitos deletérios, genéticos e ambientais (exposição a pesticidas, herbicidas e metais pesados), merecendo destaque a neuroinflamação, o estresse oxidativo, excitotoxicidade por

glutamato, disfunção mitocondrial e apoptose como possíveis agentes causais (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; SCALZO *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2010; PRZEDBORSKI, 2010; LEE; TRAN; TANSEY, 2009; WHITTON, 2007; PRZEDBORSKI, 2005; HALD; LOTHARIUS, 2005).

Neste contexto, Kurz *et al.* (2003) identificaram associação entre história familiar positiva e o risco de DP, com prevalência de 21,6% entre familiares. Adicionalmente, observa-se ligações entre a ocorrência desta enfermidade e mutações gênicas em cerca de 5 a 10% dos casos (PRZEDBORSKI; VILA, 2003; HALD; LOTHARIUS, 2005), com identificação de mutações de genes que codificam para algumas proteínas, como α -sinucleína, ubiquitina, parkina, dentre outras (LE; APPEL, 2004; CALNE, 2001; SHASTRY, 2001).

Contudo, apesar da história familiar ser um provável desencadeador da DP, a ocorrência de casos na mesma família podem não ser indicativos exclusivamente de possível causa genética, podendo resultar também da partilha do mesmo ambiente (PANKRATZ; NICHOLS; UNIACKE, 2002). De maneira que a contribuição dos fatores genéticos para o desenvolvimento da DP está estreitamente relacionada a fatores ambientais, uma vez que o primeiro remete a susceptibilidade individual e o último ao desencadeamento do processo neurodegenerativo.

A exposição a neurotoxinas, como pesticidas, inseticidas, herbicidas e metais, configuram possíveis fatores de risco para a DP (WANG *et al.*, 2011; DI MONTE, 2003). Adicionalmente o consumo de “água de mina ou poço” aparece em alguns estudos como possível fator de risco para a enfermidade, uma vez que estas águas podem estar eventualmente relacionadas com elevadas concentrações de minerais com efeitos neurotóxicos (WERNECK; ALVARENGA, 1999; TAYLOR *et al.*, 1999).

O estresse oxidativo é outro importante fator a ser analisado no processo degenerativo da DP. Muitas reações celulares utilizam o oxigênio molecular para catálise e produção de energia. Essas reações produzem espécies reativas de oxigênio (ERO's), como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila óxido nítrico (NO) (MILLER *et al.*, 2009). Em níveis baixos ou moderados, as ERO's são benéficas para execução de funções fisiológicas, contudo, em altas concentrações são prejudiciais para as membranas celulares e podem ocasionar a morte celular (MILLER *et al.*, 2009; LOH *et al.*, 2006). Deste modo, estudos apontam que o estresse oxidativo contribui desencadeando uma cascata de efeitos deletérios nas células levando à degeneração dopaminérgica na DP (MILLER *et al.*, 2009; MOSLEY *et al.*, 2006). A inibição da enzima de sintase de óxido nítrico (NOS), por exemplo, conferiu proteção frente à morte neuronal em modelo experimental para o estudo da doença (GOMES; VOZARI; DEL BEL, 2008).

De acordo com Gandhi e Wood (2005), toxinas ambientais agem por meio da inibição da cadeia respiratória mitocondrial causando seletiva degeneração dopaminérgica e acúmulo de inclusões citoplasmáticas com ubiquitina e α -sinucleína. Na DP os danos causados pelo estresse oxidativo interferem na função celular, tornando difícil determinar se o estresse oxidativo conduz, ou é uma consequência do processo degenerativo.

O estresse oxidativo também pode estar intimamente relacionado a outros processos envolvidos na morte celular, como aos efeitos tóxicos do NO (SALEHI; MASHAYEKHI, 2009). O NO, molécula produzida a partir do aminoácido L-arginina, opera em diversos processos fisiológicos no corpo humano, agindo como neurotransmissor ou neuromodulador quando sintetizado pela enzima NOS (GOMES *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2006).

Segundo West *et al.* (2002), o NO está associado à liberação e absorção de neurotransmissores, em particular a dopamina, o que sugere possível atividade no controle motor. Há evidências que o NO esteja associado à lesão neuronal, danos cerebrais por mediação da excitotoxicidade (DUNCAN; HEALES, 2005), danos ao DNA e modificações de proteínas, os quais podem promover mecanismos patogênicos envolvidos em processos neurodegenerativos (ZHANG *et al.*, 2006), além de desempenhar tanto um papel neurotóxico como neuroprotetor (GUIX *et al.*, 2005; BERNSTEIN *et al.*, 2005).

Além do estresse oxidativo e consequente disfunção mitocondrial, estudos evidenciam que a inflamação constitui também outro mecanismo importante envolvido no desenvolvimento e progressão da DP. A resposta imune local no cérebro depende da síntese de componentes inflamatórios pelas células gliais (microglia), de modo que, a partir de um insulto tóxico, estas podem produzir substâncias como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas, ERO's e espécies reativas de nitrogênio (ERN's) (FAHN; SULZER, 2004; McGEER; McGEER, 2004). Neste contexto, Chen *et al.* (2008a) e Brodacki *et al.* (2008) identificaram níveis elevados, no estriado e líquido céfalo-raquidiano, de citocinas pró-inflamatórias, citocinas associada à ativação de células T, citocinas antiinflamatórias e fatores de crescimento, uma das principais características que sustentam a relação entre neuroinflamação e doença de Parkinson.

Entretanto, de acordo com Emerit *et al.* (2004), uma das principais causas de morte celular é a excitotoxicidade induzida por glutamato, principal neurotransmissor excitatório, responsável por um terço de todas as sinapses do SNC. Concentrações excitotóxicas de glutamato, causam a despolarização excessiva do neurônio pós sináptico, gerando distúrbios da homeostasia iônica e energética, com consequente aumento na concentração de cálcio intracelular. Observa-se geração de radicais livres e lesão mitocondrial, podendo ocasionar a lise e morte celular (RUBIO-OSORNIO *et al.*, 2009).

Outro possível agente causal da DP é a apoptose. Estudos *in vivo*, *in vitro* e *post mortem* em humanos evidenciaram a morte celular por apoptose como fator etiológico para

a DP (WANG *et al.*, 2009; LEV; MELAMED; OFFEN, 2003). Contudo, ainda há muito a ser esclarecido sobre os mecanismos envolvidos na DP. Conforme Esposito *et al.* (2007), a degeneração neuronal característica desta enfermidade não resulta de somente um único fator deletério, mas da convergência de diversos fatores.

A sintomatologia da doença decorre, de maneira geral, do desequilíbrio químico causado pela morte das células que produzem a dopamina, uma catecolamina sintetizada nos terminais dos neurônios dopaminérgicos a partir da tirosina, no qual o indivíduo apresenta sinais clássicos da doença como tremor, rigidez muscular, instabilidade postural (MUANGPAISAN *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RIZELIO *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2010), bradicinesia (CHUNG *et al.*, 2012; HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011), acinesia e fácies amílica (HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Por conseguinte, resulta em perturbações do tônus, posturas anormais e movimentos involuntários (HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011) e em alguns casos, desenvolve disfunção cognitiva e evolui para quadros de demência (CHAUDHURI *et al.*, 2011).

Alguns destes sintomas podem também compor síndromes que partilham algumas ou a maior parte dos sinais da DP, além de outros sinais ou sintomas que não são característicos da doença. O termo “Parkinsonismo” é tipicamente designado para as síndromes de etiologia conhecida, tais como Parkinsonismo proveniente de lesões isquêmicas, de exposição a toxinas ou a medicamentos neurolépticos (WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

São raros os casos na DP em que os sintomas aparecem abruptamente. Nestas situações ocorre inicialmente o tremor de repouso que se exacerba durante a marcha, ao esforço mental e em situações de tensão emocional, diminui com a movimentação voluntária do segmento afetado e desaparece com o sono, acometendo preferencialmente as extremidades dos membros quase sempre distalmente (RAO; HOFMANN; SHAKIL, 2006).

Anormalidades posturais são comuns na DP e compreendem a fase mais tardia da enfermidade. Observa-se uma postura tipicamente flexionada, já que os músculos flexores e adutores tornam-se seletivamente mais contraídos, tanto nos membros superiores quanto nos membros inferiores (LEW, 2007). Diante destas alterações, os indivíduos com DP apresentam dificuldades para desviar o centro de gravidade de um pé para outro podendo inclinar-se muito para frente com o intuito de evitar a queda, ao que é denominada aceleração anterior ou festinação (ALLEN *et al.*, 2011).

Estas alterações na postura e na marcha dos indivíduos com Parkinson contribuem para elevado risco de quedas (ALLEN *et al.*, 2011) e acarretam na redução no nível de atividade gerando conseqüente imobilidade, visto que a atividade do indivíduo também é dificultada pelos episódios de bloqueio motor, denominados *freezing*, que, aliado à hipocinesia acarretam na perda de independência funcional (PROTAS *et al.*, 2005;

GAUDET, 2002). Desta forma, os marcantes comprometimentos motores, a limitação física progressiva e a deficiência no desempenho funcional fazem dos aspectos físicos um dos grandes responsáveis pela piora da qualidade de vida dos indivíduos portadores desta desordem neurodegenerativa (KEUS *et al.*, 2009; GAUDET, 2002).

Os tratamentos farmacológicos disponíveis têm como objetivo restaurar a atividade dopaminérgica para melhorar a mobilidade funcional, aumentando a qualidade de vida dos pacientes (HEISTERS, 2011). Agonistas de receptores de DA, Selegilina e Inibidores da catecol-o-metil transferase (COMT) são algumas drogas utilizadas no tratamento da DP. No entanto, nenhuma delas pode reverter ou impedir a morte neuronal (SINGH; PILLAY; YAHYA, 2007).

Nesta doença, o principal tratamento medicamentoso utilizado como tentativa de repor a falta de dopamina é o 3,4- diidroxifenilalanina (Levodopa ou L-DOPA), por ser o agente isolado mais efetivo no tratamento desta enfermidade (CHO *et al.*, 2012; HEISTERS, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RAO; HOFMANN; SHAKIL, 2006). O aumento gradual da administração oral deste precursor dopaminérgico (L-DOPA) demonstrou possibilidades de fornecer benefícios significativos e contínuos, iniciando a “Era Moderna” da terapia farmacológica. Contudo, os benefícios da farmacoterapia normalmente começam a declinar após cerca de cinco anos de uso contínuo e os efeitos colaterais incômodos se desenvolvem na forma de flutuações nas respostas motoras e discinesias, que atingem mais de 80% dos pacientes tratados, sendo considerado o conjunto mais debilitante de complicações motoras que surgem após longo período de uso da droga (CHO *et al.*, 2012; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RAO; HOFMANN; SHAKIL, 2006; CENCI; LEE; BJORKLUND, 1998; MARSDEN, 1994).

Nesta perspectiva, diante dos crescentes problemas de mobilidade na DP, o tratamento medicamentoso isolado, não é inteiramente suficiente para conter os avanços da doença (CHO *et al.*, 2012; KEUS *et al.*, 2009). Desta forma, a fisioterapia surge como uma terapia adicional que objetiva retardar a progressão motora da enfermidade, atuando sobre as limitações da marcha, postura, *balance* e capacidade física, com enfoque para força, mobilidade e resistência (ALLEN *et al.*, 2011; DERELI; YALIMAN, 2010; KEUS *et al.*, 2009).

Para tanto, são utilizadas estratégias específicas que visam melhora de desempenho, como atividades de transferências de sedestração e decúbitos, marcha, alongamento e fortalecimento de cadeias extensoras, movimentos rotacionais, dentre outros (KEUS *et al.*, 2009). Estímulos externos e cognitivos também são enfatizados durante o tratamento fisioterapêutico, de maneira que no decorrer na terapia, movimentos complexos são divididos em diferentes componentes, condicionando o indivíduo a executar todas as etapas de forma mais eficaz (KEUS *et al.*, 2009).

Keus et al. (2009), ressaltam a importância do encaminhamento precoce do paciente com DP ao tratamento fisioterapêutico. Por meio da escala de Hoehn and Yahr, que avalia a severidade da DP por meio de medidas globais de sinais e sintomas que permitem classificar o indivíduo quanto ao nível de incapacidade, os autores apontam evidências científicas de que esta terapia se faz essencial, inclusive, diante de todas as fases de evolução da doença, em virtude de sua eficácia em manter funções vitais, prevenir quedas e evitar contraturas e úlceras de pressão.

A atividade fisioterapêutica diante desta enfermidade favorece a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e também de seus familiares. Possibilita ainda a integração social destes indivíduos e reduz custos para os sistemas de saúde, à medida que retarda a progressão da doença e previne comorbidades (ALLEN *et al.*, 2011).

No entanto, mediante casos graves, em que os tratamentos, medicamentoso e fisioterapêutico, mostram-se não mais satisfatórios, existem alternativas terapêuticas diferenciadas para a DP, como a estimulação cerebral profunda e a neurocirurgia funcional para lesão do núcleo subtalâmico, técnicas que utilizam de eletrodos ou procedimentos invasivos para tratar os distúrbios do movimento (SOBSTYL; ZABEK, 2012; KHAN *et al.*, 2012; RAJPUT; RAJPUT, 2006). Todavia, estes são métodos com acentuado risco de óbito e elevado custo financeiro, de maneira que, torna-se imprescindível a busca por novas estratégias de tratamento fundamentadas em pesquisas científicas.

1.3 Modelos experimentais para estudo da doença de Parkinson

Os modelos animais visam auxiliar a compreensão de processos etiológicos e fisiopatológicos de enfermidades, o que permite aos pesquisadores testar novas terapias visando minimizar sintomas e até mesmo sanar o problema (HE; NAKAYAMA, 2009; GALTER, 2008; DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006; SCHOBBER, 2004). Um modelo animal deve possuir uma etiologia similar e função equivalente a humana, entretanto, como na DP os sintomas não se manifestam espontaneamente em animais, é fundamental a administração de agentes neurotóxicos para indução da doença (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006; SCHOBBER, 2004; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Diante disto, existem modelos animais que permitem que alguns aspectos da DP sejam melhor compreendidos. Todavia, ainda não existe nenhum modelo que possa, por si só, representar fidedignamente todos os sinais desta doença (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006; SCHOBBER, 2004; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Deste modo, a neurodegeneração do sistema dopaminérgico pode ser induzida em roedores pela aplicação de drogas como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e o paraquat, relatados brevemente nesta

revisão, e pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA), cujo mecanismo de ação será enfatizado por ter sido a neurotoxina adotada na metodologia que integra o último capítulo desta dissertação. A aplicação destas substâncias, comumente utilizadas na literatura, pode reproduzir características bioquímicas, celulares e/ou funcionais semelhantes à DP (YOKOYAMA *et al.*, 2011; MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008; BOVÉ *et al.*, 2005; PRZEDBORSKI, 2005).

O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é um composto excitotóxico sintético derivado da heroína que promove destruição irreversível nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (YOKOYAMA *et al.*, 2011; SCHOBER, 2004; PRZEDBORSKI; VILA, 2003). Comumente administrado de forma sistêmica (via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal ou intramuscular), o MPTP é altamente lipofílico e atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica, sendo convertido em 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropirídio (MPDP) em células não dopaminérgicas pela monoamina oxidase B (MAO-B). Em seguida, oxida espontaneamente para 1-metil-4-fenilpitidínio (MPP^+), que por meio de um mecanismo desconhecido é liberado no espaço extracelular. O MPP^+ não é capaz de entrar em células dopaminérgicas livremente, de modo que sua captação depende de sistemas de transporte ativos de membrana plasmática (SCHOBER, 2004).

Uma vez no interior de neurônios dopaminérgicos, a MPP^+ pode ligar-se ao transportador vesicular de monoaminas (VMAT), que é associado com uma incorporação de MPP^+ em vesículas sinápticas contendo dopamina. A MPP^+ pode acumular-se dentro da mitocôndria ou permanecer dentro do citoplasma e interagir com várias enzimas citosólicas. A administração desta substância leva a morte de células dopaminérgicas na substância negra compacta (SNc), resultando em sintomas similares aos da doença de Parkinson (SCHOBER, 2004; PRZEDBORSKI; VILA, 2003), entretanto, de acordo com Schober (2004), não há formação de corpos de Lewy em modelos animais induzidos por esta toxina.

Em virtude do seu rápido mecanismo de ação, o MPTP reproduz um modelo agudo da DP, onde o aparecimento dos sintomas comportamentais ocorre em intervalos de poucos dias, consistindo num modelo extensamente utilizado em pesquisas (YOKOYAMA *et al.*, 2011; SCHOBER, 2004). Contudo, segundo Schober (2004), a utilização desta neurotoxina para indução da DP requer adesão total das regras de segurança durante o contato com a droga, pois a mesma pode penetrar no corpo humano através da inalação, absorção e ingestão e causar prejuízos sérios em humanos, como o Parkinsonismo.

Outro agente neurotóxico que contribui para indução da DP é o paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto), um composto quartenário do amônio utilizado como herbicida, altamente tóxico, que tem sido estudado como modelo para a doença, devido às evidências que associam fortemente a exposição a pesticidas às doenças neurodegenerativas (FRANCO *et al.*, 2010). Neste contexto, Dinis-Oliveira *et al.* (2006)

evidenciaram, de acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, que a presença do paraquat sobre a proteína α -sinucleína resultou em aumento da fibrilação protéica e observaram também elevação de α -sinucleínas contendo agregados na região da substância negra de roedores após a administração desta droga, reforçando as implicações da interação direta entre esta proteína e agentes ambientais.

Quando administrado sistematicamente em animais, o paraquat induz mudanças comportamentais e bioquímicas que são compatíveis com os sintomas da DP, como rigidez aumentada, acinesia e tremor. De modo geral, estima-se que a peroxidação lipídica induzida pela droga e a consequente morte celular de neurônios dopaminérgicos, sejam os responsáveis pelo início da doença (DINIS-OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Um modelo de morte celular também pode ser produzido pela aplicação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina catecolaminérgica sintética, com estrutura semelhante a da dopamina, de fácil oxidação e que deve ser administrada diretamente via intracerebral, para que possa produzir lesões neurais (SCHOBER, 2004). A 6-OHDA tem acesso aos neurônios utilizando-se do sistema de recaptação do neurotransmissor e é transportada retrogradamente para fibras e corpos celulares dopaminérgicos, causando a morte celular gradual dos terminais nervosos assim como dos corpos neuronais (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002).

Uma vez no interior dos neurônios a toxina é oxidada em 6-OHDA quinona, que é tóxica para a célula. Os mecanismos tóxicos não estão necessariamente ligados, mas parecem agir sinergicamente durante a morte neuronal (SCHOBER, 2004). No que diz respeito ao mecanismo de ação da 6-OHDA, é bem aceito que essa neurotoxina destrói as estruturas catecolaminérgicas, com dano neuronal por um efeito combinado de ERO's e quinonas (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008).

A micro-injeção da 6-OHDA no estriado de roedores foi primeiramente descrita por Kirik, Rosenblad e Bjorklund (1998) e é considerada como um modelo útil e amplamente utilizado, já que induz a perda gradual dos neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta e a depleção de dopamina no estriado, assemelhando-se ao quadro progressivo da DP. Nos modelos animais as lesões comumente são unilaterais, o que permite a comparação entre a região lesionada e a não lesionada, fornecendo assim o controle interno da lesão e possibilitando ainda a análise da ocorrência de modificações plásticas como o aumento no número e afinidade de receptores agonistas dopaminérgicos por meio de testes comportamentais (HEUER *et al.*, 2012; SCHWARTING; HUSTON, 1996).

A 6-OHDA pode ser injetada em diferentes sítios da via nigroestriatal produzindo efeitos distintos (HEUER *et al.*, 2012; FRANCARDO *et al.*, 2011; SCHWARTING; HUSTON, 1996). No feixe prosencefálico medial causa destruição total das células dopaminérgicas da SNc, área tegmentar ventral (UNGERSTEDT, 1968) e depleção das fibras desses neurônios

no estriado ipsi lateral. Produz aumento da sensibilidade por denervação dos receptores pós-sinápticos dopaminérgicos no estriado ipsi lateral e disfunção motora, caracterizada principalmente por comportamento rotatório para o lado contralateral a micro injeção da toxina, observado mediante a administração de um agonista dopaminérgico (HEUER *et al.*, 2012; UNGERSTEDT, 1971a,b).

Após a introdução da 6-OHDA na SNc, os DA começam a se degenerar em 24 horas e após 3-4 dias essa redução chega ao máximo de dopamina, entretanto, quando a neurotoxina é injetada diretamente no estriado essa morte celular ocorre de forma retrógrada e evolui de 1-3 semanas após a lesão (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Tem sido relatado que a degeneração neuronal induzida pela 6-OHDA envolve o processamento de peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila na presença de ferro (SCHOBER, 2004; BETARBET; SHERER; GREENAMYRE, 2002). Entretanto, esta toxina não leva à formação de inclusões citoplasmáticas (SCHOBER, 2004; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Desta forma, a utilização da 6-OHDA em modelos experimentais para indução da DP mostra-se útil para rastreamento farmacológico (SCHOBER, 2004), pois ao induzir a perda de neurônios dopaminérgicos de maneira progressiva e lenta, este mecanismo favorece o aparecimento de déficits motores no decorrer do tempo, similar a instalação da doença em humanos, o que possibilita a avaliação de possíveis efeitos terapêuticos em longo prazo (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008). Outro benefício que este modelo oferece, é a possibilidade de avaliação dos sintomas motores produzidos por meio de testes comportamentais, como o teste de comportamento rotatório induzido por drogas (IANCU *et al.*, 2005; SCHOBER, 2004), mostrando-se então bastante eficaz quando se deseja avaliar efeitos neuroprotetores de substâncias sobre a DP (SCHOBER, 2004), como os produtos naturais.

Segundo Calixto (2003), medicamentos com expressiva ação biológica são, em grande parte, provenientes de produtos naturais. De modo que, estes compostos são constantemente alvos de estudos farmacológicos e comportamentais para verificação de possíveis propriedades terapêuticas.

1.4 Produtos Naturais

Compostos orgânicos provenientes de plantas, de organismos marinhos e terrestres, vertebrados e invertebrados, foram utilizados extensivamente no passado e ainda no presente tornaram-se imprescindíveis para o tratamento de diversas doenças, pois constituem novas entidades químicas de larga diversidade estrutural que funcionam como

compostos de interesse tanto na sua forma natural, como modificados para modelos semi ou totalmente sintéticos (RATCLIFFE *et al.*, 2011; BUTLER; NEWMAN, 2008; CHIN *et al.*, 2006). Assim, a utilização de recursos naturais configura-se como uma importante alternativa para a indústria farmacêutica que vem produzindo drogas mais eficazes, dotadas de maior seletividade contra várias condições patológicas e com menor incidência de efeitos não desejados (SCHMITT *et al.*, 2011). Em concordância, Calixto (2003) afirma:

“A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a utilização dos produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos”.

Deste modo, a obtenção de produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, fungos ou plantas proporcionou a compreensão de fenômenos relacionados à biologia celular e molecular e possibilitou o desenvolvimento de alguns fármacos (SCHMITT *et al.*, 2011). Nesse sentido, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna de diversas doenças foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CHIN *et al.*, 2006; CALIXTO, 2003).

Percebe-se, na atualidade, interesse governamental e profissional em associar o progresso tecnológico ao conhecimento popular e ao desenvolvimento sustentável, visando uma política de assistência a saúde eficaz e humanizada (SCHMITT *et al.*, 2011; THOMAS; JOHANNES, 2011; CHIN *et al.*, 2006; CALIXTO, 2003). No que se refere a DP, as complicações provenientes do uso prolongado do precursor dopaminérgico L-DOPA, estimulam o desenvolvimento de pesquisas em busca de estratégias de tratamento mais eficientes (GAO *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2012; JADIYA *et al.*, 2011; LI; PU, 2011; KIM *et al.*, 2011a; HU *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2010b; ZHU *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2010).

Os produtos naturais e seus princípios ativos têm se mostrado eficazes perante esta enfermidade em estudos clínicos (GAO *et al.*, 2012) e pré-clínicos utilizando culturas de células, a exemplo da administração do extrato aquoso do rizoma de *Cyperus rotundus* L. e da *Uncaria rhynchophylla* (LEE *et al.*, 2010b; SHIM *et al.*, 2009), e em animais (SONG *et al.*, 2012; JADIYA *et al.*, 2011; LI; PU, 2011; KIM *et al.*, 2011a; HU *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2004). Em ratos, o efeito neuroprotetor após lesão induzida por 6-OHDA foi demonstrado mediante a administração do extrato metanólico de *Hibiscus asper* (HRITCU *et al.*, 2011), do extrato aquoso da *Uncaria rhynchophylla* (SHIM *et al.*, 2009), do extrato de *Ginkgo biloba* L. (KIM *et*

al., 2004), das folhas de *Pueraria lobata* (ZHU *et al.*, 2010) e do extrato hidroetanólico de *Gynostemma pentaphyllum* (CHOI *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Cabral *et al.* (2009) apontaram as atividades antioxidante e antiinflamatória da própolis vermelha brasileira, importante produto natural de origem apícola com ampla propriedade biológica, que mostrou-se capaz de reduzir ou retardar a morte neuronal dopaminérgica. Em consonância, estudos *in vitro* têm reportado efeito neuroprotetor de flavonóides presentes na própolis vermelha como a pinocembrina (LIU *et al.*, 2008) e a formononetina (SUN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2008b), inclusive em cultura de neurônios dopaminérgicos (CHEN *et al.*, 2008b).

O éster ácido caféico feniletílico (CAPE), outro componente ativo da própolis, também mostrou-se eficaz ao atenuar a neurodegeneração dopaminérgica em modelo experimental da DP induzido por MPTP (FONTANILLA *et al.*, 2011). Este flavonóide também demonstrou possível efeito neuroprotetor sobre a ação da toxina 6-OHDA (NOELKER *et al.*, 2005).

Seguindo esta perspectiva, os produtos apícolas merecem destaque, pois, assim como a própolis; a geléia real, o veneno e o mel de abelhas, também têm apresentado importantes propriedades terapêuticas (RATCLIFFE *et al.*, 2011; CHERNIACK, 2010) e suscitado interesse da indústria farmacêutica para extração e identificação de novos princípios bioativos a serem utilizados na fabricação de medicamentos. Segundo Ratcliffe *et al.* (2011), o governo chinês investiu mais de 12 bilhões de dólares no desenvolvimento de novos fármacos em 2009 e os subprodutos provenientes de insetos foram intensivamente pesquisados para produção das drogas.

Por conseguinte, o crescente interesse sobre as propriedades terapêuticas derivadas dos produtos apícolas tem despertado o potencial econômico para a apicultura, uma das poucas atividades que contemplam todos os requisitos do tripé da sustentabilidade: o econômico, o social e o ecológico (SANTOS, 2009). Deste modo, Vilela (2000 apud SILVA, 2010, p. 42) definiu apicultura como tarefa de criação racional de abelhas do gênero *Apis*.

1.5 Apicultura

Considerada uma atividade sócio-econômica conservadora das espécies vegetais nativas, a apicultura refere-se a prática da criação de abelhas do gênero *Apis* para produção de mel, própolis, pólen, cera, veneno e outros produtos derivados (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2010). A recente descoberta *in situ* do apiário mais antigo do Velho Mundo, em Tel

Rehov, no vale do Jordão, ao norte de Israel, sugere que a atividade apícola remonta desde a antiguidade, aproximadamente do século IX a.C. (BLOCH *et al.*, 2010).

A identificação de cilindros de argila não cozidos, semelhantes às colméias tradicionais ainda utilizadas no Oriente Médio, sugere a localização de um possível apiário, com larga escala e dentro da cidade, indicando que as abelhas e os produtos apícolas eram valiosos e precisavam ser protegidos. Segundo os autores, algumas leis hititas, datadas dos séculos XIV e XIII a.C. continham punições severas para os ladrões de enxames e colméias, pois o mel e a cera de abelhas eram altamente valorizados como ingredientes alimentares e também empregados na técnica de fundição de metais por cera perdida, sugerindo que a apicultura certamente foi uma prática importante e bem desenvolvida durante os séculos X e IX a.C. (BLOCH *et al.*, 2010).

Em termos gerais, a apicultura possibilita a utilização permanente dos recursos naturais e atualmente apresenta um significativo retorno financeiro e de baixo impacto ao meio ambiente, podendo ser desenvolvida por pequenos produtores (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2010). Deste modo, representa além de produção e trabalho para esta população, aumento do fluxo de renda, satisfação pessoal para a maioria dos produtores, e retorno às tradições familiares para outros, favorecendo a fixação do homem no campo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

De modo geral, a apicultura caracteriza-se como um negócio familiar que vem passando por um processo de profissionalização impulsionado por um crescente mercado internacional (SANTOS, 2009; IBGE, 2009). No Brasil, a atividade apícola teve início com os jesuítas por volta do século XIX, por motivos religiosos, com a utilização da cera de abelhas européias para a confecção de velas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A introdução de abelhas africanas no país ocorreu em 1956, quando o geneticista Warwick E. Keer inseriu, num apiário experimental, exemplares desta espécie (*Apis mellifera scutellata*), devido a baixa produtividade das raças européias no Brasil e as condições tropicais. Contudo, no ano seguinte, as abelhas escaparam, disseminaram-se e cruzaram com abelhas *Apis mellifera* européias (*A. m. mellifera*; *A. m. ligustica*; *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*) (SCIANI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2004). O poli-híbrido gerado, denominado abelha africanizada, configura uma espécie altamente resistente a doenças e adaptável às condições climáticas (KERR, 1967). Desde então, o Brasil mostra-se propício para a atividade apícola devido às suas ricas e diversificadas floradas, existindo atualmente em seu território somente abelhas africanizadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2004).

Outras raças de abelhas do gênero *Apis* foram introduzidas posteriormente, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Contudo, somente na década de 80, após o desenvolvimento de técnicas adequadas e a partir do movimento naturalista, que incentivou

a utilização de alimentos saudáveis e a melhoria da qualidade de vida humana, a apicultura passou a crescer e se expandir para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2004).

Na Região Nordeste a apicultura surgiu como uma oportunidade de sobrevivência, pois proporcionou a conservação e a reconstrução dos ecossistemas num contexto onde a falta de alternativas do sertanejo, poderia induzir ao acelerado processo de degradação ambiental com a retirada de lenhas e queimadas como forma de subsistência, destruindo a cobertura vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2010). A ampla variedade de floradas e microclimas e as vastas extensões inexploradas fazem do semi-árido nordestino um local com grande potencial para a apicultura (DUARTE, 2006).

Períodos de seca nesta região são comuns em determinadas épocas do ano, e favorecem que importantes flores melíferas brotem, a exemplo do marmeleiro, aroeira, juazeiro e cajueiro (SANTOS, 2009). No litoral, é a vegetação rica em coqueiros que favorece a produção de pólen (DUARTE, 2006).

A apicultura nordestina apresenta atualmente posição de destaque nacional pela produção de mel e de outros produtos com características diferenciadas e com grande qualidade orgânica (IBGE, 2010). Este progresso deve-se as características das abelhas africanizadas, que são boas produtoras de mel e apresentam comportamento higiênico eficiente, retirando o ácaro das outras abelhas, tornando esta espécie altamente resistente a doenças, de maneira que o Brasil não precisa fazer grandes investimentos na compra de acaricidas e antibióticos. Desta forma, grande parte da produção apícola nacional não apresenta resíduos químicos (CALDERÓN *et al.*, 2010).

Neste contexto, a produção nacional de mel, em 2010, atingiu 38.017 toneladas, onde as regiões sul (43,5%) e nordeste (34,5%) apresentaram maior participação (IBGE, 2010). Assim, a grande variedade de produtos a serem explorados pela apicultura, com alto teor lucrativo e visibilidade no mercado nacional e internacional, fez desta, uma atividade integrante atualmente do Produto Interno Bruto (PIB) Brasileiro. Ainda segundo o IBGE, em 2008, o Brasil exportou 18,2 mil toneladas de mel e em 2009 as exportações excederam 26 mil toneladas, sendo os Estados Unidos e a Alemanha os maiores compradores. Neste cenário, a região nordeste foi responsável por aproximadamente 30% das exportações apícolas brasileiras, com crescimento da produção em todos os estados (IBGE, 2009).

No estado de Sergipe, onde há vegetação diversificada e variedades de espécies de abelhas, os apicultores podem ser classificados como produtores familiares, uma vez que 62% possuem entre uma e 50 colméias e 38% possuem acima de 50 colméias, sendo considerados apicultores profissionais ou comerciais. De acordo com Oliveira *et al.* (2010):

“Sergipe possui aproximadamente 16.775 colméias, e se estivessem todas povoadas e bem manejadas renderiam uma produção aproximada de 671 toneladas de mel, considerando a produtividade média de 40 kg/colméia/ano. Resultados superiores aos da Região Sul da Bahia, onde 28% dos apicultores têm menos de 10 colméias e 11,6% possuem mais que 50 colméias, e inferiores aos resultados encontrados em Alagoas, onde 78% dos apicultores possuem de uma a 50 colméias, 10% de 50 a 100 e 12% mais que 100 colméias.”

Oliveira et al. (2010) identificaram no estado de Sergipe cerca de 92% de apicultores do sexo feminino, em contraste com estudos que abordaram as regiões de Santa Catarina e Tocantins, onde esta atividade é eminentemente masculina. Entre os apicultores sergipanos, identificou-se maior número de indivíduos na faixa etária entre 26 e 40 anos de idade com maioria apresentando ensino médio completo, dados que sugerem fase de afirmação no mercado de trabalho e maior facilidade para assimilação de desenvolvimento de práticas tecnológicas, diferentemente das informações obtidas na Região Sul da Bahia e Rio Grande do Norte com número expressivo de apicultores analfabetos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Deste modo observa-se que os apicultores sergipanos apresentam qualidades positivas que podem favorecer o crescimento desse agronegócio na região.

De acordo com o plano de desenvolvimento preliminar do arranjo produtivo de apicultura sergipana (SEDECT-SE, 2008), os territórios do Alto Sertão, Leste Sergipano e Grande Aracaju possuem maior concentração da atividade apícola, com destaque para os municípios que apresentam menor índice de desenvolvimento humano (IDH), a citar: Poço Redondo, Brejo Grande, Porto da Folha, Gararu e Canindé do São Francisco. Neste contexto, ressalta-se a importância da atividade apícola para o desenvolvimento destes territórios, na medida em que, por meio desta, são gerados empregos, permitindo maior fluxo de renda nos municípios (OLIVEIRA; HANSEN, 2011).

A cidade de Nossa Senhora das Dores contém um importante exemplo de desenvolvimento da apicultura no estado de Sergipe. Nesta região, um pequeno produtor que utilizava mão-de-obra familiar, ascendeu em seu negócio e em 2002 o apiário estava preparado para receber turistas e estudantes do município, contribuindo para o crescimento econômico local e despertando jovens e crianças para a importância da variedade dos produtos provenientes desta atividade econômica. Ainda neste estado, os moradores dos povoados Tigre, em Pacatuba; Junco, em Poço Verde e Bela Vista, em Gararu, também implantaram e desenvolveram a apicultura melhorando a qualidade do mel, aprimorando a

comercialização, explorando novos produtos e obtendo importante retorno financeiro (DUARTE, 2006).

1.6 Apicultura e meio ambiente

Na tentativa de conter os crescentes avanços das degradações ambientais, um importante desafio para as futuras gerações será oferecer condições suportáveis para manutenção da espécie humana na Terra. Para tanto, torna-se imprescindível o manejo adequado de todos os recursos naturais disponíveis, considerando, inclusive, práticas alternativas de produção agrícola que respeitem o meio ambiente e reduzam a utilização de insumos e defensivos que venham a comprometer a qualidade do ambiente e do alimento produzido. De acordo com Mota (2006, apud SANTOS, 2009):

“A degradação/ exaustão dos recursos naturais bem como a exploração excessiva destes, afeta, sobremaneira, a quantidade e qualidade dos serviços ambientais, prejudicando a capacidade de resiliência de todo o sistema.”

A atividade apícola favorece também o reflorestamento de espécies, como acácia e eucalipto; possibilita a elevação da produtividade de algumas lavouras, principalmente soja e girassol; pomares e hortas, e permite ao apicultor o desenvolvimento de outras atividades simultâneas, como a agricultura e a fruticultura, otimizando o potencial produtivo da propriedade (TRAN *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2008; BASUALDO *et al.*, 2007; BASUALDO; BEDASCARRASBURE; DEJONG, 2000). O êxito na execução deste agronegócio deve ser atribuído em grande parte, ao valioso papel das abelhas na natureza como agentes polinizadores de cultivos, realizando importante serviço ambiental (CRESSWELL, 2011; LE CONTE; NAVAJAS, 2008; VANENGELSDORP *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2007).

Em contra partida, interferências humanas sobre o meio ambiente afetam sobremaneira a biodiversidade e põem em risco a perpetuação de espécies, a exemplo do aquecimento global, que afeta diretamente a vida nas colméias (LE CONTE; NAVAJAS, 2008). O aumento na temperatura ambiente de aproximadamente 2°C já é suficiente para que as abelhas migrem para fora de suas áreas de distribuição em busca de temperaturas mais amenas, dificultando a manutenção da apicultura (LE CONTE; NAVAJAS, 2008). Adicionalmente, a destruição de ambientes naturais, terrestres e costeiros, também compromete diretamente a sobrevivência destes insetos, fazendo com que ocorra

enxameação para as zonas urbanas, onde as abelhas poderão nidificar em construções, tornando-se vulneráveis as ações depredatórias humanas (MELLO; SILVA; NATAL, 2003).

A utilização de inseticidas tóxicos e a grande emissão de gases e efluentes ambientais configuram outros fatores que afastam e matam os polinizadores de cultivos (CRESSWELL, 2011; VANENGELSDORP *et al.*, 2008). Agrotóxicos, como os neonicotinóides, largamente utilizados para a proteção de culturas (CRESSWELL, 2011; ELBERT *et al.*, 2008), afetam não somente os inimigos naturais das lavouras, mas também os polinizadores, uma vez que é freqüente a presença de resíduos destes produtos em amostras de pólen retiradas de colméias (CLOYD; BETHKE, 2011; CRESSWELL, 2011). Os neonicotinóides agem como neurotoxinas que atacam o sistema nervoso central das abelhas, atuando como agonistas nicotínicos nos receptores de acetilcolina (nAChR) nas sinapses nervosas (CLOYD; BETHKE, 2011; CRESSWELL, 2011; ELBERT *et al.*, 2008), e estes insetos não conseguem voar em direção a colméia, devido ao possível efeito sobre a aprendizagem e memória, comprometendo a sobrevivência da colônia (CRESSWELL, 2011).

De acordo com Cresswell (2011), preocupações sobre impactos não intencionais causados pelo uso de neonicotinóides nas abelhas, levaram a restrições na utilização deste produto por parte dos governos da França e Alemanha. A redução destes polinizadores no ambiente poderá, dentre outras implicações, induzir a um declínio paralelo de espécies vegetais e afetar diretamente a dieta humana, pois estima-se que um terço do alimento humano provém, direta e indiretamente, da polinização realizada pelas abelhas (VANENGELSDORP *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2007). A polinização permite ainda variabilidade genética e a perpetuação das espécies com a seleção de indivíduos mais resistentes e mais adaptados (KLEIN *et al.*, 2007). Logo, favorece melhor desenvolvimento do fruto e grande variabilidade de grãos, sementes e raízes, a exemplo do abacate, limão, abóbora e melão, dentre outras plantações, polinizadas por abelhas da espécie *Apis mellifera* (ARTZ; NAULT, 2011; AFIK *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2008; DE LA HOZ, 2007; AFIK *et al.*, 2006).

1.7 Espécie: *Apis mellifera*

O gênero *Apis* pertence ao reino: *Animalia*, ao filo: *Arthropoda*, a classe: *Insecta* ou *Hexapoda*, a sub-classe: *Pterygota*, a ordem: *Hymenoptera*, a sub-ordem: *Apocrita*, a família: *Apidae* e a tribo: *Apni*, existindo uma variedade de espécies de *Apis* (MICHENER, 2007), sendo a *Apis mellifera* espécie largamente encontrada nos trópicos, na região

subártica e em toda a zona temperada. As demais espécies, *Apis florea*, *Apis dorsata* e *Apis cerana*, concentram-se no sudeste da Ásia (FREE, 1980).

As abelhas são consideradas insetos sociais, devido ao elevado grau de desenvolvimento social atingido, agrupando-se em enxames onde existe organizada distribuição de tarefas. Abelhas da espécie *Apis mellifera*, nidificam em espaços fechados, escuros, como cavidades de rochas e árvores ôcas, onde cada colônia constrói vários favos paralelos e são atraídas umas pelas outras por meio de sistemas auditivos, táteis ou químicos eficazes e formam um agrupamento dentro do seu ninho ou colméia (FITZGERALD; FLOOD, 2006; HERNÁNDEZ, 2003). Os aspectos anatômicos desta espécie consistem em um exoesqueleto, composto pelo polissacarídeo quinina, que fornece proteção para os órgãos internos, sustentação para os músculos e proteção contra a perda de água; e estrutura corpórea dividida em cabeça, tórax e abdome (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002).

A cabeça é a estrutura mais sensível do corpo e nela localizam-se: os olhos – simples (ocelos) e compostos -, as antenas, o aparelho bucal e, internamente, as glândulas. Os ocelos localizam-se na região frontal da cabeça formando um triângulo. Estas estruturas não formam imagens, mas tem a função de detectar a intensidade luminosa (DADE, 1994). Já os olhos compostos, são dois grandes olhos localizados na parte lateral da cabeça que contém estruturas menores denominadas omatídeos, cujo número varia de acordo com a casta (HORRIDGE, 2009).

Na região frontal mediana da cabeça localizam-se as duas antenas que possuem estruturas sensoriais para tato, audição e olfato (SANDOZ, 2011; KIRSCHNER *et al.*, 2006), este último, considerado um sistema de alta complexidade. Ainda na cabeça encontra-se o aparelho bucal, composto por duas mandíbulas e a língua ou glossa (EMBRAPA, 2002).

Na região do tórax destacam-se os três pares de pernas e dois pares de asas de estrutura membranosa, que atuam como órgãos locomotores, além da grande quantidade de pêlos, que possuem importante função na fixação dos grãos de pólen quando as abelhas entram em contato com as flores (EMBRAPA, 2002). No tórax também são encontrados espiráculos (órgãos de respiração), o esôfago (MEYER; WIESE, 1985) e glândulas salivares envolvidas no processamento do alimento.

O abdome da abelha *Apis mellifera* é formado por segmentos unidos por membranas bastante flexíveis que facilitam o movimento do mesmo. Nesta parte do corpo, encontram-se órgãos do aparelho digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa e glândulas produtoras de cera (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002).

No final do abdome localiza-se o ferrão, órgão de defesa das abelhas, que permanece no interior do animal em situações normais e excreta o veneno mediante situações de perigo iminente, identificadas pelo inseto. O veneno, desde a sua produção até

a liberação, abrange um percurso que compreende o sistema glandular, o saco de veneno, o bulbo do ferrão com sua respectiva organização muscular e o ferrão (HERNÁNDEZ, 2003).

O sistema glandular, que apresenta maior atividade enzimática aos 14 dias de idade (ABREU; MORAES; MATHIAS, 2010), é composto por uma glândula (localizada na região posterior do abdome, entre o reto e os ovários) que contém dois túbulos filiformes onde encontram-se várias células secretoras. As células secretoras apresentam grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vesículas secretoras, sugerindo assim uma intensa síntese de proteínas (ROAT; NOCELLI; LANDIM, 2006).

A produção destas células é recolhida em múltiplos canalículos que desembocam em um ducto comum. Este conduzirá o veneno até o saco de veneno, estrutura que tem por função armazenar a substância. Conectado a esta estrutura encontra-se o bulbo de ferrão, que apesar de não apresentar movimento próprio, funciona como uma bomba impulsionada por uma série de músculos que o circundam (ROAT; NOCELLI; LANDIM, 2006; OGAWA; KAWAKAMI; YAMAGUCHI, 1995; HIDER, 1988). Como se comunica também com o ferrão mediante contração muscular, o bulbo do ferrão permite que a substância contida no saco de veneno passe por sua estrutura e flua até ser excretada pelo ferrão da abelha (ROAT; NOCELLI; LANDIM, 2006; HIDER, 1988), como é possível visualizar na Figura 4.

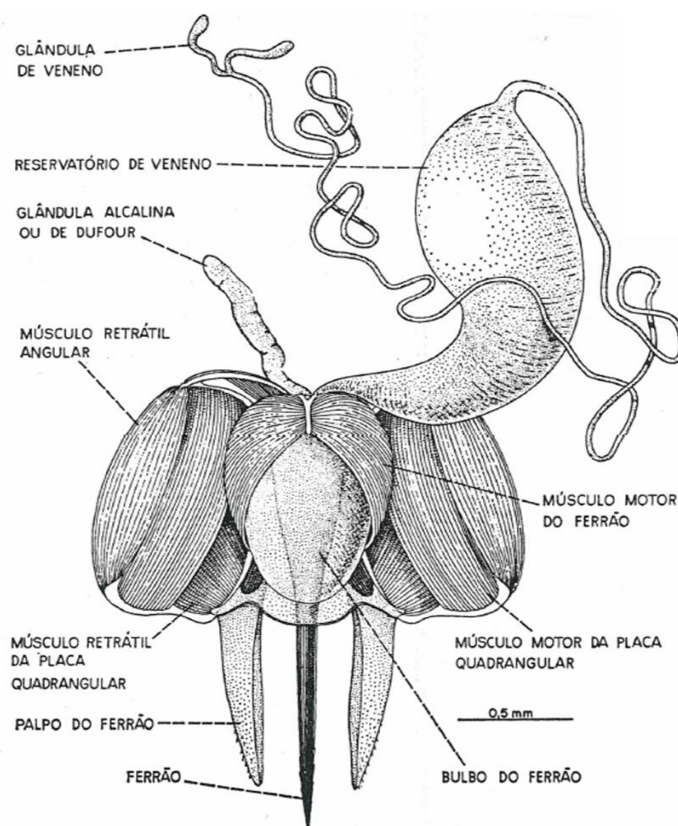


Figura 4. Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno. É possível visualizar o sistema motor composto por grupos musculares associados a três pares de placas quitinosas localizadas internamente. Fonte: CAMARGO, 1970.

O ferrão da abelha é uma estrutura rígida e farpada, composta por um componente dorsal fixo (estilete) e dois elementos ventrais, móveis no sentido longitudinal, (lancetas) que se encaixam mediante contração muscular e liberam o veneno, de maneira que, ao ser usado contra animais com tecido cutâneo elástico, como uma ave ou mamífero, permanece encravado no tecido mole da vítima (FITZGERALD; FLOOD, 2006; HERNÁNDEZ, 2003; OGAWA; KAWAKAMI; YAMAGUCHI, 2011; HIDER, 1988). Quando a abelha tenta retirá-lo, o ferrão e o sétimo seguimento abdominal são cortados e deixados *in situ*, devido a elasticidade do tecido corpóreo da vítima e a fragilidade da musculatura abdominal que prende o aparelho de ferrão das abelhas, culminando na morte do animal por exaustão ou pela perda contínua da hemolinfa, que não apresenta agentes coagulantes capazes de impedir o seu fluxo. Assim, o último gânglio nervoso e os músculos que operam o saco do veneno são deixados com o ferrão, de modo que ele continua a injetar o veneno no corpo da vítima (CHEN; LARIVIERE, 2010; FITZGERALD; FLOOD, 2006; WINSTON, 1994; HIDER, 1988; FREE, 1980).

1.8 Apiterapia

O emprego de produtos apícolas para finalidades terapêuticas, como é definida a apiterapia, remonta a antiguidade, com aplicabilidade descrita desde Hipócrates (460-370 a.C.), Aristóteles (384-332 a.C.) e Galeno (130-200 d.C.) (HELNNER *et al.*, 2007). Em virtude das propriedades cicatrizante, antibacteriana e antiinflamatória, dentre outras; o mel, a própolis e demais produtos provenientes das abelhas, foram largamente utilizados por civilizações egípcias, gregas, romanas e incas em prol da saúde humana (RATCLIFFE *et al.*, 2011; MARCUCCI, 1996).

Segundo Ratcliffe *et al.* (2011), os insetos compõem cerca de 75% de todas as espécies animais e provavelmente muitos fatores naturais auxiliaram sua sobrevivência diante dos numerosos insultos ambientais ocorridos ao longo de sua evolução, que remete ao período de 4 a 5 milhões de anos. Cerca de 300 espécies de insetos ainda são utilizadas na medicina tradicional chinesa e comumente os medicamentos são extraídos mediante picadas de abelhas e vespas, e até mesmo dos corpos ou secreções dos artrópodes (RATCLIFFE *et al.*, 2011; MITCHELL, 2006).

Estes compostos oferecem excelentes fontes com altas concentrações de enzimas ativas, citocinas e neurotoxinas, que servem como ferramentas para estudo do funcionamento subcelular dos sistemas nervoso e cardiovascular dos mamíferos (MITCHELL, 2006). Recentemente este fato tem sido reconhecido por várias empresas, em virtude da grande exploração de produtos naturais provenientes de insetos, utilizando

modernas técnicas de análises bioquímica e molecular (RATCLIFFE *et al.*, 2011; MITCHELL, 2006).

Neste sentido, convém ressaltar a importante atividade antibacteriana do mel de abelhas, cujo mecanismo de ação tem alcançando estirpes resistentes aos antibióticos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Adicionalmente, resultados positivos têm sido obtidos frente a processos de cicatrização e também mediante quadros de rinite alérgica após administração de mel ou da geléia real (RATCLIFFE *et al.*, 2011). Até mesmo a própolis, resina produzida pelas abelhas a partir de brotos, ramos e botões florais de diversas partes das plantas, apresenta suas propriedades biológicas ratificadas constantemente pela literatura e suas atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral, dentre outras, são amplamente exploradas (RIGHI *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2009; AWALE *et al.*, 2008).

A terapia com veneno de abelhas tem sido utilizada na medicina tradicional chinesa, bem como na antiga Grécia e Egito, há milhares de anos, para o tratamento da artrite, reumatismo e outras doenças auto-imunes, bem como contra o câncer, doenças de pele, dor e infecções (RATCLIFFE *et al.*, 2011; CHEN; LARIVIERE, 2010). Segundo Chen e Lariviere (2010), a composição da apitoxina desperta o interesse da comunidade científica desde o século XIX, e na década de 80 já estimava-se a importância deste possível agente terapêutico na medicina ocidental.

As toxinas produzidas por animais venenosos contêm compostos que podem ser aproveitados no desenvolvimento de uma ampla gama de fármacos. E, a utilização do veneno de abelhas no cenário atual, configura-se como uma proposta diferenciada de produto a ser extraído da apicultura e com grande visibilidade no mercado externo (MATYSIAK *et al.*, 2011; DAMACENA; HELMER; SANTOS, 2005). Em consonância, Son *et al.* (2007) afirmam:

“As empresas farmacêuticas estão atualmente financiando extensa investigação sobre o potencial do veneno, como a próxima geração de drogas no combate ao câncer.”

Na Europa e em alguns mercados globais (a citar: Alemanha, Eslováquia, França, Bulgária e Rússia) existem algumas fórmulas farmacêuticas registradas com o veneno de abelha bruto (MATYSIAK *et al.*, 2011). A terapia com a utilização deste produto tem sido relatada como eficaz no tratamento de algumas enfermidades, possivelmente em virtude de suas propriedades antiinflamatórias, principalmente sobre as doenças reumáticas descritas desde Zurier *et al.* (1973). Um exemplo é a artrite reumatóide, doença inflamatória autoimune, onde Park *et al.* (2004) e Son *et al.* (2007) relataram que houve diminuição da

expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), da fosfolipase A₂ (PLA₂) e dos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, NO e ERO em virtude das propriedades do veneno.

Deste modo, a apiterapia com o veneno de abelha tem apresentado também ação cicatrizante (HAN *et al.*, 2011) e resultados positivos até mesmo mediante quadros oncológicos (ORŠOLIĆ, 2011; PARK *et al.*, 2010) e sobre outras doenças, em especial as que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC), cujos estudos serão minuciosamente descritos no item 1.9.2.. Assim, devido ao reconhecimento de suas propriedades terapêuticas no meio científico, a apitoxina configura-se como um recurso altamente relevante a ser continuamente explorado a favor da saúde humana.

Um importante exemplo é a pesquisa realizada por Lee *et al.* (2010a), onde o tratamento com veneno de abelhas apresentou resultados favoráveis inclusive diante de condições ateroscleróticas. Administrado via intraperitoneal, a toxina reduziu a formação de placas ateroscleróticas e o nível de lipídios séricos em camundongos. O tratamento com a apitoxina diminuiu também o colesterol total e o teor de triglicérides, enquanto aumentava a lipoproteína de alta densidade (HDL-C) nos animais com aterosclerose experimental.

Outro estudo recente que apresentou resultados altamente relevantes sobre o assunto, foi realizado por ORŠOLIĆ (2011), onde o autor evidenciou que a apitoxina apresenta resultados positivos quando utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles os cânceres de bexiga, fígado, mama, próstata, pulmão e rim. Segundo a pesquisa, a destruição das células cancerígenas ocorre principalmente pela ação dos componentes melitina, fosfolipase A₂ e apamina, elementos que agem contra as células tumorais. Deste modo, as vastas propriedades biológicas da apitoxina, e de seus principais componentes, fazem deste, um importante produto apícola com largo potencial de aplicabilidade terapêutica.

1.9 Apitoxina

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas com objetivo de proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores, que vão desde outros artrópodes a vertebrados (ORŠOLIĆ, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; FITZGERALD; FLOOD, 2006; HIDER, 1988). Indivíduos da espécie *Apis mellifera* produzem apitoxina por meio de uma glândula de secreção ácida e outra de secreção alcalina, localizadas no interior do abdômen da abelha operária, e esta substância consiste em uma mistura complexa de enzimas (KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010;

PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988), peptídeos (MATYSIAK *et al.*, 2011; KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988) e aminoácidos (ZHOU *et al.*, 2010; HIDER, 1988), além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios (HIDER, 1988) - Conforme Quadro 1.

Quadro 1: Componentes da apitoxina.

CLASSE DA MOLÉCULA	COMPONENTES	REFERÊNCIAS
ENZIMAS	FOSFOLIPASE A ₂	SCIANI <i>et al.</i> , 2010; FERREIRA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2010; ZHOU <i>et al.</i> , 2010; LEE <i>et al.</i> , 2010; HIDER, 1988
	HIALORUNIDASE	HIDER, 1988
PROTEÍNAS PEQUENAS E PEPTÍDEOS	MELITINA	MATYSIAK <i>et al.</i> , 2011; KOKOT <i>et al.</i> , 2011; SCIANI <i>et al.</i> , 2010; ZHOU <i>et al.</i> , 2010; LEE <i>et al.</i> , 2010; FERREIRA-JUNIOR <i>et al.</i> , 2010; PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988
	APAMINA	MATYSIAK <i>et al.</i> , 2011; KOKOT <i>et al.</i> , 2011; ZHOU <i>et al.</i> , 2010; HIDER, 1988
	PEPTÍDEO MCD	MATYSIAK <i>et al.</i> , 2011; KOKOT <i>et al.</i> , 2011; HIDER, 1988
	TERTIAPINA; PROCAMINA; SECAPINA	HIDER, 1988
AMINAS FISIOLÓGICAMENTE ATIVAS	HISTAMINA, DOPAMINA, NORADRENALINA	HIDER, 1988
AÇÚCARES	GLUCOSE, FRUTOSE	HIDER, 1988
FOSFOLIPÍDEOS		HIDER, 1988
AMINOÁCIDOS	ÁCIDO γ-AMINO-BUTÍRICO; α-AMINOÁCIDOS	ZHOU <i>et al.</i> , 2010; HIDER, 1988
COMPONENTES VOLÁTEIS (FEROMÔNIOS)	ÉSTERES COMPLEXOS	HIDER, 1988

Dentre os componentes da apitoxina destacam-se a melitina e a fosfolipase A₂, que constituem os principais componentes do veneno, representando juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988). Adicionalmente, a composição da apitoxina pode variar em função da sazonalidade e entre regiões geográficas (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010).

A melitina tem pH altamente básico (YANG *et al.*, 2011), e constitui um tipo de peptídeo anfipático, hidrossolúvel, que consiste de 26 aminoácidos com 6 cargas positivas (KEITH; ESHLEMAN; JANOWSKY, 2011; ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010). Os quatro resíduos de aminoácidos com cargas positivas e 6 resíduos de aminoácidos com hidrofília são localizados no fim carboxi-terminal, enquanto os 2 resíduos de aminoácidos com cargas positivas e 20 resíduos de aminoácidos com hidrofobia são situados no fim aminoterminal (ZHOU *et al.*, 2010). De acordo com a literatura, a melitina apresenta intensa atividade hemolítica (ORŠOLIĆ, 2011; ZHOU *et al.*, 2010; BOGAART *et al.*, 2008), efeito analgésico significativo (ZHOU *et al.*, 2010) e importante ação antiinflamatória (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), antibacteriana e antifúngica (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011), e apresenta ainda ação antiviral e antitumoral (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010).

Em contrapartida está a fosfolipase A₂, enzima de natureza glicoprotéica que catalisa a hidrólise de fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas celulares e desencadeia fenômenos bioquímicos em cascata, que convergem para o aparecimento de reações inflamatórias. É um dos principais componentes imunogênicos do veneno de *Apis mellifera* e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação com a melitina (ORŠOLIĆ, 2011; FITZGERALD; FLOOD, 2006; OWNBY *et al.*, 1997; SCHUMACHER; EGEN, 1995).

A extração da apitoxina pode ser realizada por meio da estimulação manual. Esta técnica, que culmina na morte do animal, consiste numa leve pressão no abdome da abelha que favorecerá a expulsão do veneno pelo ferrão, sendo este veneno líquido coletado por meio de uma microcápsula (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988). Contudo, comumente é realizada a extração elétrica.

Segundo Gramacho, Malaspina e Palma (1992), a técnica de coleta por extração elétrica tem sido utilizada desde meados de 1950 e consiste na colocação de um coletor, composto por placas de vidro e gerador de pulsos, conectado a bateria ou a outra fonte de energia, no alvado da colméia. Quando as abelhas pousam sobre a placa, recebem um choque e reagem no intuito de ferroar a placa coletora elétrica, depositando uma carga de veneno entre o vidro e o material protetor do equipamento, local onde seca e depois é raspado e vendido para a indústria farmacêutica ou laboratório especializado, por exemplo,

para ser utilizado em favor da saúde humana (ZHOU *et al.*, 2010; DAMACENA; HELMER; SANTOS, 2005; OBISPO, 2002; HIDER, 1988).

A principal vantagem desta forma de obtenção da apitoxina, é que não provoca a morte do animal e ainda preserva o ferrão da abelha (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010). Adicionalmente, estima-se que, independente do método de coleta, em uma ferroada a abelha libera 1µg do veneno seco (HIDER, 1988).

1.9.1 Ação da apitoxina na membrana celular

A introdução da apitoxina nos tecidos celulares desencadeia uma série de reações biológicas na membrana, que variam de acordo com a diversidade bioquímica de seus constituintes. Elementos como fosfolipase A₂, melitina, hialorunidase, apamina e peptídeo degranulador de mastócitos (MCD) interagem com a membrana celular ocasionando importantes reações locais e sistêmicas no organismo atingido (ORŠOLIĆ, 2011; FITZGERALD; FLOOD, 2006).

Fisiologicamente, interstícios celulares são preenchidos por ácido hialurônico, um biopolímero que possui propriedades adesivas. A hialorunidase, enzima presente na apitoxina, em contato com a célula, quebra as moléculas de ácido hialurônico em pequenos fragmentos, formando uma solução intercelular menos viscosa que facilita a penetração de outros componentes do veneno. Por esta razão, a hialorunidase é freqüentemente denominada fator de difusão da apitoxina (FITZGERALD; FLOOD, 2006; DOTIMAS; HIDER, 1987).

Em seguida, a fosfolipase A₂, enzima hidrolisadora de fosfolipídios da membrana plasmática, gera moléculas tipo detergente e provoca a formação de poros transmembrânicos (ORŠOLIĆ, 2011). Estes poros permitem o extravazamento de nutrientes e conseqüente lise nas células, alterando a conformação das cadeias celulares (ORŠOLIĆ, 2011; DOTIMAS; HIDER, 1987).

Com a hidrólise de fosfolipídios, ocorre também a liberação de ácido araquidônico, dando início ao ciclo metabólico desse ácido graxo essencial, que começa pelo processo de ativação das enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase. Estas enzimas são responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, importantes mediadores químicos da inflamação (NAM *et al.*, 2003).

Entretanto, dentre os componentes da apitoxina destaca-se a melitina, peptídeo que representa cerca de 50% do peso seco do veneno, e possui várias ações biológicas, farmacológicas e toxicológicas, incluindo forte atividade na superfície de membranas lipídicas celulares atuando de forma hemolisadora (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011;

FITZGERALD; FLOOD, 2006). A melitina pode ligar-se rapidamente a membranas lipídicas, adotando a conformação α -helicoidal anfipática paralela ou perpendicular ao plano da membrana. A configuração paralela é inativa, enquanto a perpendicular é embutida na membrana e necessária para a formação de poros (BOGAART *et al.*, 2008). Deste modo, a superfície hidrofóbica da melitina liga-se a membrana causando seu enfraquecimento e conseqüente afinamento e destruição celular, causando a formação de poros, fusão e vesiculação (ORŠOLIĆ, 2011). Adicionalmente, ao interromper as membranas celulares, a melitina libera aminas biogênicas e potássio, sendo também responsável pela liberação de histaminas, o qual é considerado agente responsável pelo mecanismo de dor local (FITZGERALD; FLOOD, 2006).

Em estudo realizado por Moon *et al.* (2007), foi identificado que a apitoxina e a melitina possuem potente efeito supressor sobre respostas pró-inflamatórias. A apitoxina exerceu efeito antiinflamatório por suprimir a transcrição gênica da cicloxigenase e citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-1 β , IL-6 e TNF- α . Adicionalmente, Nam *et al.* (2003), também identificaram que o veneno de abelhas atua sobre o processo anti-inflamatório por meio da inibição da expressão de COX-2 e do bloqueio de citocinas pró-inflamatórias. Igualmente, a adolapina, peptídeo que compõe o peso seco do veneno, inibe a síntese de prostaglandinas por meio da inibição da atividade da ciclooxigenase (CHEN; LARIVIERE, 2010)

Uma vez difundido no tecido celular, outros componentes de importante relevância do veneno de abelhas *Apis mellifera*, também passam interagir, como a apamina, um peptídeo que apresenta um modo de ação altamente específico devido a forte influência sobre as membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico. Em doses muito pequenas estimula o SNC e em doses elevadas torna-se neurotóxico (ORŠOLIĆ, 2011; FITZGERALD; FLOOD, 2006). Com 10 aminoácidos, a apamina impede a despolarização e bloqueia os canais de potássio ativados pelo íon cálcio (Ca²⁺) na membrana, impedindo a ação fisiológica da adrenalina de abrir este canal (ORŠOLIĆ, 2011; ZHOU *et al.*, 2010).

Com estrutura similar a apamina, o peptídeo MCD é constituído de 22 resíduos de aminoácidos (ORŠOLIĆ, 2011; CHEN; LARIVIERE, 2010) e difere-se da melitina por apresentar 2 pontes dissulfídicas (HABERMANN, 1972). Segundo Fitzgerald e Flood (2006) e Dotimas e Hider (1987), o peptídeo MCD é capaz de degranular mastócitos mesmo em baixas concentrações. A atividade antiinflamatória da apitoxina também decorre da ação deste componente, que gera bloqueio do ácido araquidônico (ORŠOLIĆ, 2011; FITZGERALD; FLOOD, 2006).

1.9.2 Efeitos da apitoxina no Sistema Nervoso Central

A exploração da apitoxina no meio científico tem evidenciado diversas propriedades deste produto (LEE *et al.*, 2012; ORŠOLIĆ, 2011; HAN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011a; LEE *et al.*, 2010a; YUN; SUN, 2010; PARK *et al.*, 2010, CHEN; LARIVIERE, 2010; SON *et al.*, 2007; HIDER, 1988; ZURIER *et al.*, 1973). No que se refere a sua ação no Sistema Nervoso Central (SNC), estudos apontam potencial efeito neuroprotetor do veneno de abelhas sobre determinadas doenças como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (YANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010), a doença de Alzheimer (SUN *et al.*, 2004) e a doença de Parkinson (YOON *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011a,b; DOO *et al.*, 2010).

Alguns ensaios clínicos sugeriram que a apitoxina pode ser empregada no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla (NAMAKA *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2005), considerada uma doença crônica, auto-imune e progressiva. A etiologia desta enfermidade é desconhecida, mas apresenta a susceptibilidade individual como um dos possíveis fatores desencadeantes. Na esclerose múltipla, uma deficiência no sistema imunológico do indivíduo faz com que ele desenvolva anticorpos capazes de agredir a mielina do SNC, deste modo, o déficit funcional decorre das anormalidades de condução (MIRSHAFIEY, 2007). Em ambos estudos (NAMAKA *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2005), os autores sugerem pesquisas adicionais, para ratificar o mecanismo positivo de ação da apitoxina sobre a fisiopatologia da doença e chamam atenção para os possíveis riscos de reações alérgicas ao veneno.

Pesquisas contemporâneas demonstraram que a administração de apitoxina, e do seu principal componente, melitina, na fase de progressão da ELA também gerou resultados importantes (YANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010). A neuroinflamação é uma característica patológica presente em pacientes com ELA. Como mediadores críticos da inflamação, a micróglia ativada e níveis elevados do fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α) são detectados no SNC e a doença caracteriza-se pela degeneração de neurônios motores superiores e inferiores do córtex motor, tronco encefálico e coluna espinhal, cujos principais sintomas consistem em fraqueza muscular, atrofia, espasticidade e paralisia de músculos voluntários (LEE *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2010). Estima-se que a excitotoxicidade por glutamato esteja envolvida na etiologia desta doença, e segundo Lee *et al.* (2012), a apitoxina diminui esta toxicidade mediante doenças neurodegenerativas, reduzindo a morte neuronal.

Neste contexto, Yang *et al.* (2010) identificaram que a injeção subcutânea de 0,1 μ g/g do veneno de abelha em camundongos transgênicos na fase sintomática de progressão da

doença, gerou aumento de 18% na taxa de sobrevivência destes animais em comparação ao grupo controle e provocou aumento da atividade motora, devido ao efeito neuroprotetor fornecido pelos níveis reduzidos de citocinas, indicando que a apitoxina agiu terapêuticamente contra o início da disfunção motora e contra a progressão da ELA nos animais. Assim, os autores concluíram que o tratamento com apitoxina reduziu a ativação das células microgliais, suprimiu a neuroinflamação induzida pela morte de neurônios motores e impediu a ruptura mitocondrial.

Por conseguinte, com o objetivo de determinar se somente a melitina poderia suprimir a perda de neurônios motores e a configuração anormal de proteínas em modelos animais de ELA, Yang et al. (2011), injetaram 0,1 µg/ g deste peptídeo, via subcutânea, em camundongos transgênicos e como resultado evidenciaram que, apesar de não aumentar o tempo de vida das cobaias, a melitina foi suficiente para melhorar a atividade motora destes animais, retardou os sintomas patológicos em uma semana e reduziu eventos neuroinflamatórios no tronco encefálico e coluna espinhal, além de restaurar um aumento de 50% na atividade proteossômica no tronco encefálico e 40% de aumento na coluna lombar. Os resultados deste estudo sugerem uma potencial ligação funcional entre a melitina e a inibição da neuroinflamação em modelo animal de ELA, com implicações importantes para o tratamento de outras doenças no SNC.

Outra enfermidade neurológica abordada recentemente é a DP. Em pesquisa realizada por Chung et al. (2012), os autores identificaram que a apitoxina promoveu a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (DA) em modelo de Parkinson induzido por MPTP. Adicionalmente, em modelo animal da doença induzido por esta mesma neurotoxina, Kim et al. (2011a), evidenciaram que a injeção subcutânea com 1,2 mg/Kg de apitoxina pode atenuar a ativação da resposta da micróglia, atuando com possível efeito neuroprotetor da DP. Neste estudo, camundongos tratados com apitoxina apresentaram melhora nas percentagens de sobrevivência das células TH + para 70% no 1º dia e 78% no 3º dia, em comparação com camundongos normais. A apitoxina também resultou na redução da expressão de marcadores de inflamação do antígeno de macrófagos complexo-1 (MAC-1) e sintase de óxido nítrico (iNOS) na substância negra pars compacta, sugerindo potencial inibição de eventos neuroinflamatórios induzidos por MPTP.

Segundo Chung et al. (2012) e Kim et al. (2011a), o possível mecanismo pelo qual a apitoxina reduziu a perda celular dopaminérgica, decorre de interações com vias de citocinas pró-inflamatórias. Do mesmo modo, Son et al. (2007) e Park et al. (2004), demonstraram que a apitoxina inibe a expressão de genes inflamatórios como a COX-2 e também a geração de TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS e ERO mediante condições inflamatórias.

O veneno de abelha também foi evidenciado como um possível método preventivo potencial para a DP por meio da acupuntura, de acordo com Doo et al. (2010). Após duas

semanas de tratamento com injeções subcutâneas com 0,02 mL de apitoxina, os camundongos foram intoxicados com 20 mg/ Kg, via intra peritoneal, de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). O estudo mostrou que a acupuntura com apitoxina previne a perda de neurônios dopaminérgicos e fibras dopaminérgicas estriatais induzidas pelo MPTP em modelo agudo de Parkinson experimental. Mostrou também que a acupuntura com veneno de abelha pode diminuir as células fosfo-Jun-imunorreativas induzidas por MPTP na substância negra, protegendo neurônios dopaminérgicos da toxicidade por MPTP e melhorando a disfunção comportamental, configurando-se como um método preventivo potencial para a DP. Em concordância, Yoon et al., (2013) realizaram estudo com metodologia análoga e complementaram a pesquisa com análise imunohistoquímica e por espectroscopia de ressonância magnética e ratificaram o possível efeito neuroprotetor da apitoxina a partir de alterações no complexo glutamato/ creatina dos grupos avaliados.

Nesta perspectiva, Cho et al. (2012) realizaram estudo piloto em humanos associando a apitoxina com a acupuntura a fim de explorar a eficácia desta técnica, isolada e com veneno de abelhas, como terapia adjuvante para doença de Parkinson idiopática. Todos os 43 adultos envolvidos na pesquisa haviam feito uso de medicamento antiparkinsoniano por pelo menos um mês. Como resultado, o grupo tratado com acupuntura com veneno de abelhas mostrou melhora significativa na pontuação total da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS), bem como nos quesitos de atividades de vida diária e exame motor, e na escala de equilíbrio de Berg, enquanto os participantes que receberam apenas o tratamento com acupuntura isolada apresentaram melhoras significativas na pontuação total da UPDRS com ênfase somente no quesito exame motor, e na escala de depressão de Beck e os controles não apresentaram nenhuma mudança significativa após as oito semanas de tratamento.

No estudo, a acupuntura e a acupuntura com veneno de abelhas mostraram resultados promissores como terapias adjuvantes para a doença de Parkinson, com destaque para o segundo grupo (CHO et al., 2012). Deste modo, é possível notar a efetividade da apitoxina como um potente recurso para o tratamento de diversas enfermidades, sobretudo as que acometem o SNC, desempenhando possível efeito neuroprotetor.

2. REFERÊNCIAS

ABI-DARGHAM, A.; LARUELLE, M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. **European Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 2005.

ABI-DARGHAM, A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. 1-5, 2004. Suplemento 1.

ABI-DARGHAM, A.; RODENHISER, J.; PRINTZ, D.; ZEA-PONCE, Y.; GIL, R.; KEGELES, L. S.; WEISS, R.; COOPER, T. B.; MANN, J. J.; VAN HEERTUM, R. L.; GORMAN, J. M.; LARUELLE, M. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 8104-8109, 2000.

ABREU, R. M. M.; MORAES, R. L. M. S.; MATHIAS, M. I. C. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, *Apidae*). **Micron**, v. 41, n. 2, p. 172-175, 2010.

AFIK, O.; DAG, A.; KEREM, Z.; SHAFIR, S. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 1949-1963, 2006.

AFIK, O.; DAG, A.; YESELSON, Y.; SCHAFFER, A.; SHAFIR, S. Selection and breeding of honey bees for higher or lower collection of avocado nectar. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 2, p. 228-33, 2010.

ALLEN, N. E.; SHERRINGTON, C.; PAUL, S. S.; CANNING, C. G. Balance and Falls in Parkinson's Disease: A Meta-analysis of the Effect of Exercise and Motor Training. **Movement Disorders**, v. 26, n. 9, p. 1605-1615, 2011.

ALVAREZ-FISCHER, D.; HENZE, C.; STRENZKE, C.; WESTRICH, J.; FERGER, B.; HÖGLINGER, G. U.; OERTEL, W. H.; HARTMANN, A. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 182-193, 2008.

ARTZ, D. R.; NAULT, B. A. Performance of *Apis mellifera*, *Bombus impatiens*, and *Peponapis pruinosa* (Hymenoptera: *Apidae*) as pollinators of pumpkin. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008.

BASUALDO, M.; BEDASCARRASBURE, E.; DE JONG, D. Africanized honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) have a greater fidelity to sunflowers than European bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 2, p. 304-307, 2000.

BASUALDO, M.; RODRÍGUEZ, E. M.; BEDASCARRASBURE, E.; DE JONG, D. Selection and estimation of the heritability of sunflower (*Helianthus annuus*) pollen collection behavior in *Apis mellifera* colonies. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 2, p. 374-381, 2007.

BENDIN, S.; FERRAZ, A. C. Organização funcional dos circuitos dos núcleos da base afetados na doença de Parkinson e na discinesia induzida pela levodopa. **Saúde em Revista**, v. 5, n. 9, p. 77-88, 2003.

BERNSTEIN, H. G.; BOGERTS, B.; KEILHOFF, G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia Research**, v. 78, n. 1, p. 69-86, 2005.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **BioEssays**, v. 24, n. 4, p. 308-18, 2002.

BLOCH, G.; FRANCOY, T. M.; WACHTEL, I.; PANITZ-COHEN, N.; FUCHS, S.; MAZAR, A. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11240-11244, 2010.

BOGAART, G. V. D.; GUZMA' N, J. V.; MIKA, J. T.; POOLMAN, B. On the Mechanism of Pore Formation by Melittin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 33854-33857, 2008.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. **NeuroRx – The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 2, n. 3, p. 484-494, 2005.

BRODACKI, B.; STASZEWSKI, J.; TOCZYLOWSKA, B.; KOZLOWSKA, E.; DRELA, N.; CHALIMONIUK, M.; STEPIEN, A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. **Neuroscience Letters**, v. 441, n. 2, p. 158-162, 2008.

BUTLER, M. S.; NEWMAN, D. J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholestemics and anticancer drug discovery. **Progress in Drug Research**, v. 65, n. 1, p. 3-44, 2008.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CALDERÓN, R. A.; VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J.; SANCHEZ, L. A. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Experimental & applied acarology**, v. 50, n. 4, p. 281-297, 2010.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CALNE, D. B. Parkinson's disease is not one disease. **BC Medical Journal**, v. 43, n. 3, p. 129-132, 2001.

CASTRO, H. J.; MENDEZ-LNOCENCIO, J. I.; OMIDVAR, B.; OMIDVAR, J.; SANTILLI, J.; NIELSEN, H. S. JR.; PAVOT, A. P., RICHERT, J. R., BELLANTI, J. A. A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. **Allergy Asthma Proceedings**, v. 26, n. 6, p. 470-476, 2005.

CENCI, M. A.; LEE, C. S.; BJORKLUND, A. L-Dopa-Induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. **The European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 2694-2706, 1998.

CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; ROSSI, S.; PICCONI, B.; PISANI, A.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P.; BAUNEZ, C. Subthalamic nucleus lesion reverses motor abnormalities and striatal glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 831-840, 2005.

CHAUDHURI, K. R.; ODIN, P.; ANTONINI, A.; MARTINEZ-MARTIN, P. Parkinson's disease: The non-motor issues. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 17, n. 10, p. 717-723, 2011.

CHEN, H.; O'REILLY, E. J.; SCHWARZSCHILD, M. A.; ASCHERIO, A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. **American Journal of Epidemiology**, v. 167, n. 1, p. 90-95, 2008a.

CHEN, H. Q.; WANG, X. J.; JIN, Z. Y.; XU, X. M.; ZHAO, J. W.; XIE, Z. J. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pretense* on dopaminergic neurons. **Neuroscience Research**, v. 62, n. 2, p. 123-130, 2008b.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151-183, 2010.

CHERNIACK, E. P. Bugs as drugs, Part 1: insects. The "New" alternative medicine for the 21st century? **Alternative medicine review**, v. 15, n. 2, p. 124-135, 2010.

CHIN, Y-W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. 239-253, 2006.

CHO, S-Y.; SHIM, S-R.; RHEE, H. Y.; PARK, H-J.; JUNG, W-S.; MOON, S-K.; PARK, J-M.; KO, C-N.; CHO, K-H.; PARK, S-U. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 8, p. 948-952, 2012.

CHOI, H. S.; PARK, M. S.; KIM, S. H.; HWANG, B. Y.; LEE, C. K.; LEE, M. K. Neuroprotective effects of herbal ethanol extracts from *Gynostemma pentaphyllum* in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2814-2824, 2010.

CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.

CLOYD, R. A.; BETHKE, J. A. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. **Pest Management Science**, v. 67, n. 1, p. 3-9, 2011.

CRESSWELL, J. E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 149-157, 2011.

DADE, H. A. **Anatomy and dissection of the honeybee**. Oxford: International Bee Research Association, 1994. 158 p.

DAMACENA, J.F.V.; HELMER, L.A.; SANTOS, M.R. dos. **Projeto técnico empreendedor: Empresa Júnior apícola**. Escola Agrotécnica Federal de Colatina, Espírito Santo, 2005. 22f.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DE LA HOZ, J. C. Bee (*Apis mellifera*, Hymenoptera: *Apoidea*) visitation to cantaloupe *Cucumis melo* (*Cucurvitaceae*) flowers in Panama. **Revista de Biología Tropical**, v. 55, n. 2, p. 677-80, 2007.

DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 7, p. 281-285, 1990.

DELONG, M.; WICHMANN, T. Update on models of basal ganglia function and dysfunction. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, p. 237-240, 2009. Suplemento 3.

DERELI, E. E.; YALIMAN, A. Comparison of the effects of a physiotherapist-supervised exercise programme and a self-supervised exercise programme on quality of life in patients with Parkinson's disease. **Clinical Rehabilitation**, v. 24, n. 4, p. 352-362, 2010.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease In Rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303-317, 2002.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; REMIÃO, F.; CARMO, H.; DUARTE, J. A.; NAVARRO, A. S.; BASTOS, M. L.; CARVALHO, F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 6, p.1110-1122, 2006.

DI MONTE, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 531-538, 2003.

DOO, A-R.; KIM, S. T.; KIM, S-N.; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K.; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010. Supplement 1.

DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee world**. v. 2, p. 51-71, 1987.

DUARTE, R. B. A. História de sucesso: agronegócios: apicultura. 1 ed. Brasília: Sebrae, 2006.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 67-96, 2005.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p.1099-1105, 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção - Produção de mel**. Teresina, v. 3, p. 1-136, 2002.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 58, n. 1, p. 39-46, 2004.

ESPOSITO, E.; Di MATTEO, V.; BENIGNO, A.; PIERUCCI, M.; CRESCIMANNO, G.; Di GIOVANNI, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 205, n. 2, p. 295-312, 2007.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **Neuro RX: The journal of the American Society for experimental Neurotherapeutics**, v. 1, n. 1, p. 139-154, 2004.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 355-362, 2010.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera Stings. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 4, p. 194-204, 2006.

FONTANILLA, C. V.; MA, Z.; WEI, X.; KLOTSCHKE, J.; ZHAO, L.; WISNIOWSKI, P.; DODEL, R. C.; FARLOW, M. R.; OERTEL, W. H.; DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 188, p. 135-141, 2011.

FRANCARDO, V.; RECCHIA, A.; POPOVIC, N.; ANDERSSON, D.; NISSBRANDT, H.; CENCI, M. A. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 327-340, 2011.

FRANCO, R.; LI, S.; RODRIGUEZ-ROCHA, H.; BURNS, M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 289-300, 2010.

FREE, J. B. **The social organization of honeybees**. 1 ed. São Paulo: EPU - Editora da Universidade de São Paulo, 1980.

FUJIYAMA, F. **Anatomical connections of the basal ganglia**. Brain Nerve, v. 61, n. 4, p. 341-349, 2009.

GALTER, D. Parkinson's disease: recent progress. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 7, p. 1369, 2008.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 7, p. 1459-1474, 2008.

GANDHI, S.; WOOD, N. W. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 18, p. 2749-2755, 2005.

GAO, X.; CASSIDY, A.; SCHWARZSCHILD, M. A.; RIMM, E. B.; ASCHERIO, A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, n. 15, p. 1138-1145, 2012.

GAUDET, P. Measuring the impact of Parkinson's disease: An occupational therapy perspective. **Canadian Journal of Occupational Therapy**, v. 69, n. 2, p. 104-113, 2002.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, n. 8-9, p. 987-1041, 1996.

GRAMACHO, K. P.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Avaliação da produtividade de veneno em abelhas africanizadas pela utilização da técnica de coleta por estimulação elétrica. **Naturalia**, v. 1, p. 265, 1992.

GOMES, M. Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. **Brain Research**, v. 1203, p. 160-169, 2008.

GOTO, Y.; GRACE, A. A. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. **International Review of Neurobiology**, v. 78, p. 41-68, 2007.

GUILLIN, O.; ABI-DARGHAM, A.; LARUELLE, M. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. **International Review of Neurobiology**, v. 78, p. 1-39, 2007.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

HAAXMA, C. A.; BLOEM, B. R.; BORM, G. F.; OYEN, W. J.; LEENDERS, K. L.; ESHUIS, S.; BOOIJ, J.; DLUZEN, D. E.; HORSTINK, M. W. Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 819-24, 2007.

HABERMANN, E. Bee and Wasp venoms. **Science**, v. 177, n. 4046, p. 314-322, 1972.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 279-290, 2005.

HAN, S.; LEE, K.; YEO, J.; KIM, W.; PARK, K. Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 3, p. 67-72, 2011.

HE, X. J.; NAKAYAMA, H. Neurogenesis in Neurotoxin-induced Animal Models for Parkinson's Disease - A Review of the Current Status. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 22, n. 2, p. 22: 101-108, 2009.

HEISTERS, D. Parkinson's: symptoms, treatments and research. **British Journal of Nursing**, v. 20, n. 9, p. 548-554, 2011.

HELLNER, M.; WINTER, D.; VON GEORGI, R.; MÜNSTEDT, K. Apitherapy: Usage And Experience In German Beekeepers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 475-479, 2008.

HERNÁNDEZ, R. V. Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. **Iatreia**, v. 16, n. 3, p. 217-227, 2003.

HEUER, A.; SMITH, G. A.; LELOS, M. J.; LANE, E. L.; DUNETT, S. B. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 30-43, 2012.

HIDER, R. C. HONEYBEE VENOM: A rich source of pharmacologically active peptides. **Endeavour**, v. 12, n. 2, p. 60-65, 1988.

HORRIDGE, A. What does an insect see? **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 17, p. 2721-2729, 2009.

HRITCU, L.; FOYET, H. S.; STEFAN, M.; MIHASAN, M.; ASONGALEM, A. E.; KAMTCHOING, P. Neuroprotective effect of the methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 585-591, 2011.

HU, S.; HAN, R.; MAK, S.; HAN, Y. Protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+)- induced apoptosis by water extract of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) in SH-SY5Y cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 1, p. 34-42, 2011.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. Drug-induced behavioral tests. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da agropecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 37, p. 1-55. Brasil. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, p.1-65, 2010.

JADIYA, P.; KHAN, A.; SAMMI, S. R.; KAUR, S.; MIR, S. S.; NAZIR, A. Anti-Parkinsonian effects of *Bacopa monnieri*: insights from transgenic and pharmacological *Caenorhabditis*

elegans models of Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 4, p. 605-610, 2011.

KEITH, D. J.; ESHLEMAN, A. J.; JANOWSKY, A. Melittin stimulates fatty acid release through non-phospholipase-mediated mechanisms and interacts with the dopamine transporter and other membrane-spanning proteins. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 501-510, 2011.

KERR, W. E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v. 39, p. 3-5, 1967.

KEUS, S. H. J.; MUNNEKE, M.; NIJKRAKE J. M.; KWAKKEL, G.; BLOEM, R. B. Physical Therapy in Parkinson's Disease: Evolution and Future Challenges. **Movement Disorders**, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2009.

KHAN, S.; GILL, S. S.; MOONEY, L.; WHITE, P.; WHONE, A.; BROOKS, D. J.; PAVESE, N. Combined pedunculo pontine-subthalamic stimulation in Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, n. 14, p. 1090-1095, 2012.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209-217, 2011a.

KIM, K. W.; KIM, H. W.; LI, J.; KWON, Y. B. Effect of bee venom acupuncture on methamphetamine-induced hyperactivity, hyperthermia and Fos expression in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 84, n. 1, p. 61-68, 2011b.

KIM, M. S.; LEE, J. I.; LEE, W. Y.; KIM, S. E. Neuroprotective effect of *Ginkgo biloba* L. extract in a rat model of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 663-666, 2004.

KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAM, T. W.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; LEE, H. J.; HAN, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. **The Journal of veterinary medical science**, v. 65, n. 3, p. 349-355, 2003.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Experimental Neurology**, v. 152, n. 2, p. 259-277, 1998.

KIRSCHNER, S.; KLEINEIDAM, C. J.; ZUBE, C.; RYBAK, J.; GRÜNEWALD, B.; RÖSSLER, W. Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 6, p. 933-952, 2006.

KLEIN, A-M.; VAISSIE`RE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KOKOT, Z. J.; MATYSIAK, J.; URBANIAK, B.; DEREZIŃSKI, P. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 7, p. 2487-2494, 2011.

KOPRICH, J. B.; JOHNSTON, T. H.; HUOT, P.; FOX, S. H.; BROTHIE, J. M. New insights into the organization of the basal ganglia. **Current Neurology and Neuroscience Report**, v. 9, n. 4, p. 298-304, 2009.

KURZ, M.; ALVES, G.; AARSLAND, D.; LARSEN, J. P. Familial Parkinson's disease: a community-based study. **European Journal of Neurology**, v. 10, n. 2, p. 159-163, 2003.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 303-312, 2008.

LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-535, 2006.

LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique**, v. 27, n. 2, p. 485-997, 499-510, 2008.

LE, W.; APPEL, S. H. Mutant genes responsible for Parkinson's disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n.1, p. 79-84, 2004.

LEE, W. R.; KIM, S. J.; PARK, J. H.; KIM, K. H.; CHANG, Y. C.; PARK, Y. Y.; LEE, K. G.; HAN, S. M.; YEO, J. H.; PAK, S. C.; PARK, K. K. Bee venom reduces atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory mechanism. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1077-1092, 2010a.

LEE, C. H.; HWANG, D. S.; KIM, H. G.; OH, H.; PARK, H.; CHO, J. H.; LEE, J. M.; JANG, J. B.; LEE, K. S.; OH, M. S. Protective effect of *Cyper* rhizoma against 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 3, p. 564-571, 2010b.

LEE, J. K.; TRAN, T.; TANSEY, M. G. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Journal of the Neuroimmune Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 419-429, 2009.

LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2012.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 245-250, 2003.

LEW, M. Overview of Parkinson's disease. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 12, p. 155-160, 2007.

LI, S.; PU, X. P. Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1291-1296, 2011.

LIU, R.; GAO, M.; YANG, Z. H.; DU, G. H. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both *in vivo* and *in vitro*. **Brain Research**, v. 1216, p. 104-115, 2008.

LOH, K. P.; HUANG, S. H.; De SILVA, R.; TAN, B. K.; ZHU, Y. Z. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. **Current Alzheimer Research**, v. 3, n. 4, p. 327-337, 2006.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêutica dos constituintes químicos da própolis. **Revista Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARSDEN, C. D. Problems with long-term levodopa therapy for Parkinson's disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 17, n. 2, p. 32-44, 1994.

MATYSIAK, J.; SCHMELZER, C. E. H.; NEUBERT R. H. H.; KOKOT, Z. J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 273-278, 2011.

McGEER, P. L.; McGEER, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 10, p. 3-7, 2004. Suplemento 1.

MELLO, M. H. S. H.; SILVA, E. A.; NATAL, D. Africanized bees in a metropolitan area of Brazil: shelters and climatic influences. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 237-41, 2003.

MENDONÇA, K.; MARCHINI, L. C.; SOUZA, B. DE A.; ALMEIDA-ANACLETO, D.; MORETI, A. C. Important bee plants to the africanized honey Bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in a fragment of savannah in Itirapina, São Paulo State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 513-521, 2008.

MEREDITH, G. E; SONSALLA, P.; CHESSELET, M-F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 385-398, 2008.

MEYER, C. R.; WIESE, H. Breves noções de morfologia e anatomia das abelhas. In: WIESE, H. **Nova apicultura**, Porto Alegre: ed. Agropecuária, Cap. 3, 1985.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2 ed. United States of America: The Johns Hopkins, 2007.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 1, p. 55-65, 2009.

MIRSHAFIEY, A. Venom therapy in multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 3, p. 353-361, 2007.

MITCHELL, A. Africanized Killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**, v. 26, n. 3, p. 23-32, 2006.

MOON, D. O.; PARK, S. Y.; LEE, K. J.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; KIM, M. O.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 8, p. 1092-1101, 2007.

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M. D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H. E. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 5, p. 261-281, 2006.

MUANGPAISAN, W.; MATHEWS, A.; HORI, H.; SEIDEL, D. A Systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 94, n. 6, p. 749-755, 2011.

NAM, K. W.; JE, K. H.; LEE, J. H.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; KANG, S. K.; MAR, W. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1beta) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. **Archives Pharmacology Research**, v. 26, n. 5, p. 383-388, 2003.

NAMAKA, M.; CROOK, A.; DOUPE, A.; KLER, K.; VASCONCELOS, M.; KLOWAK, M.; GONG, Y.; WOJEWNIAK-SMITH, A.; MELANSON, M. Examining the evidence: Complementary adjunctive therapies for multiple sclerosis. **Neurological Research**, v. 30, n. 7, p. 710-719, 2008.

NAMBU, A. Seven problems on the basal ganglia. **Current Opinion in Neurobiology**, v.18, p. 595-604, 2008.

NOELKER, C.; BACHER, M.; GOCKE, P.; WEI, X.; KLOCKGETHER, T.; DU, Y.; DODEL, R. The flavanoide caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 383, n. 1-2, p. 39-43, 2005.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2. ed., Jaboticabal: FUNEP, 2002.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; BENITEZ-TEMINO, B.; BLESÁ, F. J.; GURIDI, J.; MARIN, C.; RODRÍGUEZ, M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, suplemento 3, p. 548-559, 2008a.

OBESO, J. A.; MARIN, C.; RODRIGUEZ-OROZ, C.; BLESÁ, J.; BENITEZ-TEMIÑO, B.; MENA-SEGOVIA, J.; RODRÍGUEZ, M.; OLANOW, C. W. The Basal Ganglia in Parkinson's Disease: Current Concepts and Unexplained Observations. **Annals of neurology**, v. 64, suplemento 2, p. 30-46, 2008b.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; ARBIZU, J.; GIMÉNEZ-AMAYA, J, M. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. **News in Physiological Sciences**, v. 17, p. 51-55, 2002.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRIGUEZ, M.; DELONG, M. R.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. **Annals of Neurology**, v. 47, n. 4, suplemento 1, p. 22-32, 2000a.

OBESO, J. A.; OLANOW, C. W.; NUTT, J. G. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 23, suplemento 10, p. 2-7, 2000b.

OBISPO, T. Nuevos conceptos en la fabricación de extractos de veneno de himenópteros. **Alergología Inmunología Clínica**, v. 17, p. 215-220, 2002.

OGAWA, H.; KAWAKAMI, Z.; YAMAGUCHI, T. Proprioceptors involved in stinging response of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 10, p. 1358-1367, 2011.

OGAWA, H.; KAWAKAMI, Z.; YAMAGUCHI, T. Motor pattern of the stinging response in the honeybee *Apis mellifera*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 1, p. 39-47, 1995.

OLIVEIRA, M. E. C.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe, Brasil. **Scientia Plena**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2010.

OLIVEIRA, M. S.; HANSEN, D. L. Políticas Públicas e Desenvolvimento: O papel do núcleo de arranjos produtivos locais de Sergipe. **Scientia plena**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2011.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 173-194, 2011.

OWNBY, C. L.; POWELL, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER J. E. Melittin and phospholipase A₂ from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 67-80, 1997.

PACÁKOVÁ, V.; STULÍK, K. Validation of a method for determination of phospholipase A₂ and melittin in bee venom preparations by capillary electrophoresis. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 549-554, 2000.

PANKRATZ, N.; NICHOLS, W. C.; UNIACKE, S. K. Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson's disease in a sample without parkin mutations. **American Journal of Genetics**, v. 71, n.1, p. 124-35, 2002.

PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, S. J.; LEE, W. R.; LEE, K. G.; PARK, K. K. Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- α and actinomycin D. **Archives Pharmacal Research**, v. 33, n. 2, p. 215-223, 2010.

PARK, H. J.; LEE, S. H.; SON, D. J.; OH, K. W.; KIM, K. H.; SONG, H. S.; KIM, G. J.; OH, G. T.; YOON, D. Y.; HONG, J. T. Antiarthritic Effect of Bee Venom - Inhibition of Inflammation Mediator Generation by Suppression of NF-KB Through Interaction With the p50 Subunit. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3504-3515, 2004.

PROTAS, E. J.; MITCHELL, K.; WILLIAMS, A.; QURESHY, H.; CAROLINE, K.; LAI, E. C. Gait and step training to reduce falls in Parkinson's disease. **NeuroRehabilitation**, v. 20, n. 3, p. 183-190, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine mouse model: A tool to explore the pathogenesis of parkinson's disease. **Annals of New York Academy of Science**, v. 991, p. 189-198, 2003.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, Suplemento 1, p. 3-7, 2005.

PRZEDBORSKI, S. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. **Movement Disorders**, v. 25, Suplemento 1, p. 55-57, 2010.

PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 5-6, p. 685-693, 2011.

RAJPUT, A.; RAJPUT, A. H. Parkinson's disease management strategies. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 6, n. 1, p. 91-99, 2006.

RAO, S. S.; HOFMANN, L. A.; SHAKIL, A. Parkinson's disease: diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 74, n. 12, p. 2046-2054, 2006.

RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747-769, 2011.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 2011.

RIZELIO, V.; SZAWKA, R. E.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; RIGON, P.; SAUR, L.; MATHEUSSI, F.; DELATTRE, A. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MENESES, M.; FERRAZ, A. C. Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 85-95, 2010.

ROAT, T. C.; NOCELLI, R. C. F.; LANDIM, C. C. The venom gland of queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, *Apidae*): morphology and secretory cycle. **Micron**, v. 37, n. 8, p. 717-723, 2006.

ROH, D. H.; KIM, H. W.; YOON, S. Y.; KANG, S. Y.; KWON, Y. B.; CHO, K. H.; HAN, H. J.; RYU, Y. H.; CHOI, S. M.; LEE, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents. **The Journal of Pain: Official journal of the American Pain Society**, v. 7, n. 7, p. 500-512, 2006.

ROUSE, S. T.; MARINO, M. J.; BRADLEY, S. R.; AWAD, H.; WITTMAN, M.; CONN, P. J. Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 3, p. 427-435, 2000.

RUBIO-OSORNIO, M.; MONTES, S.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; AGUILERA, P.; FLORIANO-SÁNCHEZ, E.; MONROY-NOYOLA, A.; RÍOS, C.. Cooper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation by MPP⁺ in rats. **Neurochemistry International**, v. 4, n.7, p. 447-451, 2009.

SALEHI, Z.; MASHAYEKHI, F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 90-93, 2009.

SAMII, A.; NUTT, J. G.; RANSOM, B. R. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 363, n. 29, p.1783-1793, 2004.

SANDOZ, J. C. Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, n. 98, p. 1-20, 2011.

SANTOS, C. S. **Diagnóstico da flora apícola para sustentabilidade da apicultura no estado de Sergipe**. (Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente). Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju, SE, Brasil, 2009.

SCALZO, P.; de MIRANDA, A. S.; GUERRA AMARAL, D. C.; de CARVALHO, V. M.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA, A. L. Serum levels of chemokines in Parkinson's disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 4, p. 240-244, 2011.

SCHAPIRA, A. H. V.; EMREB, M.; JENNER, P.; POEWE, W. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 16, n. 9, p. 982-989, 2009.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 215-224, 2004.

SCHUMACHER, M. J.; EGEN, N. B. Significance of Africanized bees for public health. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 19, p. 2038-2043, 1995.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 215-266, 1996.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA-JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptídes**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

SEDECT-SE (Secretaria de estado do desenvolvimento econômico e da ciência e tecnologia governo de Sergipe): Plano de desenvolvimento preliminar do arranjo produtivo de apicultura sergipana. APL-SE: Núcleo estadual de arranjos produtivos locais, p. 1-32, setembro, 2008.

SHASTRY, B. S. Parkinson's disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. **Neuroscience Research**, v. 41, n. 1, p. 5-12, 2001.

SHIM, J. S.; KIM, H. G.; JU, M. S.; CHOI, J. G.; JEONG, S. Y.; OH, M. S. Effects of the hook of *Uncaria rhynchophylla* on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 2, p. 361-365, 2009.

SILVA, E. **Apicultura sustentável**: Produção e comercialização de mel no sertão Sergipano. (Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju, SE, Brasil, 2010.

SINGH, N.; PILLAY, V.; YAHYA, E. C. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 1, p. 29-44, 2007.

SMITH, G. A.; HEUER, A.; DUNNETT, S. B.; LANE, E. L. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting L-DOPA induced dyskinesia. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 281-292, 2012.

SOBSTYL, M.; ZĄBEK, M. Stereotactic radiosurgery for movement disorders. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 46, n. 1, p. 52-62, 2012.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246-270, 2007.

SONG, J. X.; SZE, S. C.; NG, T. B.; LEE, C. K.; LEUNG, G. P.; SHAW, P. C.; TONG, Y.; ZHANG, Y. B. Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines: what have we got from neurotoxic models? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 698-711, 2012.

SOUZA, D.C. Importância Socioeconômica. In: _____. **Apicultura**: Manual do Agente de Desenvolvimento Rural. Brasília: SEBRAE, Cap. 4 e 5, p. 35-41, 2004.

SUN, G. Y.; XU, J.; JENSEN, M. D.; SIMONYI, A. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 205-213, 2004.

SUN, M.; ZHOU, T.; ZHOU, L.; CHEN, Q.; YU, Y.; YANG, H.; ZHONG, K.; ZHANG, X.; XU, F.; CAI, S.; YU, A.; ZHANG, H.; XIAO, R.; XIAO, D.; CHUI, D. Formononetin protects neurons against hypoxia-induced cytotoxicity through upregulation of ADAM 10 and sA β PP α . **Journal of Alzheimers Disease**, v. 28, n. 4, p. 795-808, 2012.

TAYLOR, C. A.; SAINT-HILAIRE, M. H.; CUPPLES, L. A.; THOMAS, C. A.; BURCHARD, A. E.; FELDMAN, R. G.; MYERS, R. H. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. **American Journal of Genetics**, v. 88, n. 6, p. 742-749, 1999.

THOMAS, G. L.; JOHANNES, C. W. Natural product-like synthetic libraries. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 4, p. 516-522, 2011.

TRAN, V. H.; DUKE, R. K.; ABU-MELLAL, A.; DUKE, C. C. Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. **Phytochemistry**, v. 81, p. 126-132, 2012.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107-110, 1968.

UNGERSTEDT, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 367, p. 49-68, 1971a.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 367, p. 69-93, 1971b.

VANENGELSDORP, D.; HAYES J. JR.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. 4071-4077, 2008.

WANG, A.; COSTELLO, S.; COCKBURN, M.; ZHANG, X.; BRONSTEIN, J.; RITZ, B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 7, p. 547-555, 2011.

WANG, W.; BU, B.; XIE, M.; ZHANG, M.; YU, Z.; TAO, D. 2009. Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. **Progress in neurobiology**, v. 89, n. 1, p. 1-17, 2009.

WERNECK, A. L.; ALVARENGA, H. Genetics, Drugs and Environmental Factors in Parkinson's Disease. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 57, n. 2-B, p. 347-355, 1999.

WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P.; GRACE, A. A. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. **Synapse**, v. 44, n. 4, p. 227-245, 2002.

WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Advances in Neurology**, v. 91, p. 9-18, 2003.

WICHMANN, T.; DOSTROVSKY, J. O. Pathological basal ganglia activity in movement disorders. **Neuroscience**, v. 198, p. 232-244, 2011.

WHITTON, P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 963-976, 2007.

WINSTON, M. L. The Africanized "Killer" bee: biology and public health. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 87, n. 5, p. 263-267, 1994.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H-O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, suplemento 1, p. 1-58, 2011.

YANG, E. J.; JIANG, J. H.; LEE, S. M.; YANG, S. C.; HWANG, H. S.; LEE, M. S.; CHOI, S. M. Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 69, 2010.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011.

YOKOYAMA, H.; KUROIWA, H.; KASAHARA, J.; ARAKI, T. Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. **Acta Neurobiologia e Experimentalis**, v. 71, n. 2, p. 269-280, 2011.

YOON, M-H.; LEE, D-W.; KIM, H-J.; CHUNG, J-Y.; DOO, A-R.; PARK, H-J.; KIM, S-N.; CHOE, B-Y. Investigation of the neuroprotective effects of bee-venom acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease by using immunohistochemistry and In-vivo1H magnetic resonance spectroscopy at 9.4 T. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 62, n. 2, p. 320-327, 2013.

YUN, S. P.; SUN, B. C. Apipuncture treatment for central post-stroke pain. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 2, p. 223-224, 2010.

ZHANG, L.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology Therapy**, v. 109, n. 1-2, p. 33-41, 2006.

ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector-tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 171-178, 2010.

ZHU, G.; WANG, X.; CHEN, Y.; YANG, S.; CHENG, H.; WANG, N.; LI, Q. Puerarin protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine neurotoxicity via inhibiting apoptosis and upregulating glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of Parkinson's disease. **Planta Medica**, v. 76, n. 16, p. 1820-1826, 2010.

ZURIER, R. B.; MITNICK, H.; BLOOMGARDEN, D.; WEISSMANN, G. Effect of bee venom on experimental arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 32, n. 5, p. 466-470, 1973.

CAPÍTULO II

**EFEITOS DA APITOXINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL
DE CAMUNDONGOS.**

EFEITOS DA APITOXINA SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS.

Camila Gomes Dantas^a, Tássia Luiza Gonçalves Magalhães Nunes^a,
Tâmara Luiza Gonçalves Magalhães Nunes^a, Ailma Oliveira da Paixão^a,
Kátia Peres Gramacho^a, Waldecy de Lucca Júnior^b, Juliana Cordeiro
Cardoso^a, Margarete Zanardo Gomes^a.

^aInstituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Laboratório de Morfologia e
Biologia Estrutura, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300,
Farolândia. Aracaju/SE, Brasil. Cep: 49032-490 Tel./Fax: (79) 3218-
2190.

^bUniversidade Federal de Sergipe, Departamento de Morfologia, Cidade
Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, S/N,
Jardim Rosa Elze. São Cristóvão/SE, Brasil. Cep: 49100-000

Endereço para correspondência:

Avenida Murilo Dantas, nº 300, Farolândia, Aracaju/ Sergipe.

CEP: 49032-490

Tel.: (79) 3218-2100

E-mail: guetezanardo@yahoo.com.br

RESUMO

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas. No que se refere à sua ação sobre o Sistema Nervoso Central, estudos têm apontado potencial efeito neuroprotetor desta substância sobre diversas doenças. Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos farmacológicos da apitoxina sobre o sistema nervoso central, por meio de testes de comportamento, com particular ênfase para o sistema dopaminérgico. Para tanto, 35 camundongos foram divididos em sete grupos: salina; apitoxina (0,1 mg/Kg); apitoxina (1,2 mg/Kg); haloperidol; haloperidol/apitoxina 0,1 mg/Kg; haloperidol/apitoxina 1,2 mg/Kg e diazepam. Foram realizados os testes de catalepsia, campo aberto, estereotipia induzida por apomorfina e labirinto em cruz elevado. A administração aguda de apitoxina induziu atividade cataléptica apenas quando administrada a dose de 1,2 mg/kg, efeito este semelhante ao do haloperidol ($p = 0,04$). O grupo haloperidol/apitoxina 1,2 mg/kg apresentou menor tempo de catalepsia em relação aos grupos que receberam apenas apitoxina (1,2 mg/kg) ($p = 0,09$) ou haloperidol ($p = 0,05$). Em contrapartida, a menor dose de apitoxina (0,1 mg/kg) não mostrou modificação significativa quando associada ao tratamento com haloperidol ($p = 0,07$). No teste de campo aberto, os grupo haloperidol e apitoxina (1,2 mg/kg) promoveram redução significativa das explorações horizontais (ambos com $p < 0,0001$). Esta mesma dose de apitoxina induziu diminuição em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$), à exceção do grupo tratado com haloperidol ($p = 0,90$). O efeito da administração de apitoxina na dose 1,2 mg/kg foi modificado quando precedido do tratamento com haloperidol ($p = 0,02$). A dose de apitoxina 0,1 mg/kg, não promoveu alterações significativas ($p = 0,80$). Ambas as doses de apitoxina, bem como o tratamento com haloperidol, mostraram redução significativa das explorações verticais em relação aos controles ($p = 0,001$ e $p = 0,001$) e ao grupo haloperidol/apitoxina 1,2 mg/kg ($p = 0,009$ e $p = 0,007$). Ainda, houve aumento significativo do comportamento de autolimpeza no grupo apitoxina (1,2 mg/kg) em relação ao grupo salina ($p = 0,021$). No teste de estereotipias induzidas por apomorfina houve diminuição significativa, quando ambas as doses de apitoxina foram pré-administradas ($p = 0,032$). A apitoxina não promoveu efeitos significativos na avaliação do labirinto em cruz elevado ($p = 0,25$). Em conclusão, a apitoxina na dose de 1,2 mg/kg reduziu a atividade motora, o *grooming*, as estereotipias induzidas por apomorfina e promoveu efeito cataléptico, de maneira análoga ao haloperidol. Estes efeitos foram diminuídos pelo pré-tratamento com haloperidol, sugerindo ação antipsicótica da apitoxina.

Palavras-chave: veneno de abelhas, catalepsia, campo aberto, estereotipias induzidas por apomorfina.

ABSTRACT

Experimental studies have shown that bee venom may have neuroprotective effects on some neurological diseases. This work aimed to examine the pharmacological effects of bee venom on the central nervous system, with particular emphasis on the dopaminergic transmission. For this purpose, 35 mice were divided into seven groups: saline; apitoxin (0.1 mg/kg), bee venom (1.2 mg/kg), haloperidol, haloperidol/apitoxin 0.1 mg/kg; haloperidol/apitoxin 1.2 mg/kg and diazepam. They were performed the tests of catalepsy, open field, apomorphine-induced stereotypy and elevated plus maze. Acute administration of bee venom (1.2 mg/kg) induced catalepsy, this effect been similar to haloperidol ($p = 0.04$). When administered together, haloperidol/apitoxin 1.2 mg/kg resulted in decreased catalepsy from apitoxin (1.2 mg / kg) ($p = 0.09$) or haloperidol ($p = 0.05$) alone. In contrast, bee venom at lower dose (0.1 mg/kg) did not induced catalepsy or produced significant change when associated with haloperidol treatment ($p = 0.07$). Also, both haloperidol and bee venom (1.2 mg/kg) caused significant reduction in crossings in the open field when compared to other treatments ($p < 0.0001$) and the effect of bee venom was modified by the pre-treatment with haloperidol. The dose of 0.1 mg/kg did not promote significant changes ($p = 0.80$). Both doses of bee venom and the treatment with haloperidol induced significant reduction of rearing behavior when compared to controls ($p = 0.001$ and $p = 0.001$) and the group haloperidol/apitoxin 1.2 mg/kg ($p = 0.009$ and $p = 0.007$). Still, there was a significant increase in the *grooming* behavior from bee venom (1.2 mg/kg) to the saline group ($p = 0.021$). Both doses of apitoxin promoted a significant decrease in the apomorphine-induced stereotypies ($p = 0.032$). Any significant effects were observed in the elevated plus maze test ($p = 0.25$), except for diazepam. In conclusion, bee venom in a dose of 1.2 mg/kg reduced the motor activity, *grooming*, the stereotypies induced by apomorphine and promoted cataleptic effect, similar to haloperidol. Also, these effects were reduced by pretreatment with haloperidol, suggesting antipsychotic action of bee venom.

Keywords: bee venom, catalepsy, open field, apomorphine-induced stereotypy.

1. INTRODUÇÃO

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas do gênero *Apis* e consiste numa mistura complexa de enzimas, peptídeos e aminoácidos, além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios. Dentre os componentes da apitoxina destacam-se a melitina e a fosfolipase A₂, que representam juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988).

Estudos têm revelado importantes propriedades biológicas da apitoxina e seus componentes, como ação anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2007), anti-nociceptiva (ROH *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2003), antiaterogênica (LEE *et al.*, 2010), cicatrizante (HAN *et al.*, 2011), anti-tumoral (ORŠOLIĆ, 2011; SON *et al.*, 2007) e hepatoprotetora (PARK *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi demonstrado que o veneno de abelha não apresentou sinais de toxicidade sobre os sistemas nervoso, cardiovascular, respiratório ou gastrointestinal de roedores quando administrado por via subcutânea (s.c.) até a dose de 1mg/kg (KIM *et al.*, 2004).

No que se refere ao Sistema Nervoso Central (SNC), estudos têm apontado potencial efeito neuroprotetor da apitoxina sobre diversas doenças. Pesquisas experimentais demonstraram que acupuntura associada à administração de 0,1 µg/g apitoxina (YANG *et al.*, 2010) e da melitina (YANG *et al.*, 2011), na fase de progressão da esclerose lateral amiotrófica reduziu a ativação das células microgliais, suprimiu a neuroinflamação, diminuiu a morte de neurônios motores, impediu o dano mitocondrial e gerou aumento na taxa de sobrevivência dos animais.

Em modelo experimental da doença de Parkinson (DP) pela aplicação de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), a apitoxina aplicada nas doses de 1 (i.p.) – 1,2 mg/kg (s.c.) aumentou a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (CHUNG *et al.*, 2012) e também resultou na redução da expressão de marcadores de neuroinflamação na substância negra compacta (KIM *et al.*, 2011a). Quando associada à acupuntura (0,02 mL; s.c.), a apitoxina melhorou a disfunção comportamental, preveniu a perda de neurônios e fibras estriatais dopaminérgicas e diminuiu a expressão de células fosfo-Jun-reativas na substância negra, mostrando ação neuroprotetora frente à toxicidade causada MPTP *in vivo* (DOO *et al.*, 2010). Em humanos, a associação da apitoxina com a acupuntura (0,005 mL) gerou resultados promissores, com melhora significativa na pontuação total da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS) e na escala de equilíbrio de Berg, sugerindo potencial aplicabilidade como terapia adjuvante para a DP (CHO *et al.*, 2012).

Estas doenças podem ser mediadas também pela excitotoxicidade glutamatérgica, a qual foi inibida em cultura de células neuronais e gliais tratadas com apitoxina (LEE *et al.*,

2012). Estudo *in vitro* também revelou ação neuroprotetora da apitoxina em células SH-SY-5Y expostas ao MPTP (DOO *et al.*, 2012).

Em adição, a apitoxina (0,1 a 10 mg/ml; 20µl; s.c.) induziu ativação de neurônios catecolaminérgicos no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos (KWON *et al.*, 2004). Quando associada à acupuntura em ponto antinociceptivo, foi capaz de reduzir a hiperatividade resultante da metanfetamina, promovendo aumento na expressão de Fos em núcleos dopaminérgicos como *acumbens*, substância negra e *locus coeruleus* (KIM *et al.*, 2011b).

Apesar da vasta gama de utilizações propostas para a apitoxina, os efeitos farmacológicos decorrentes de sua administração sobre o SNC em condições fisiológicas são pouco abordados. Em adição, estudos recentes apontam para uma interação deste composto com complexos sistemas neurais. Assim, a compreensão dos efeitos da apitoxina sobre condições motoras, emocionais e cognitivas pode favorecer o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para desordens mentais como esquizofrenia, medo e ansiedade. O objetivo deste estudo consistiu em analisar os efeitos farmacológicos da apitoxina sobre o sistema nervoso central, por meio de testes de comportamento, com particular ênfase para o sistema dopaminérgico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Submissão do estudo ao Comitê de Ética e Pesquisa

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Tiradentes, em 10 de maio de 2011, e aprovado mediante protocolo nº.050511. Todos os procedimentos ocorreram em conformidade com as normas do COBEA.

2.2 Amostra

A amostra deste estudo foi composta por 35 camundongos suíços, machos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximada de 25 a 30g. Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de (22°C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas e água *ad libitum* e dieta padrão Labina ® (Purina, São Paulo, Brasil). Os grupos experimentais foram assim definidos: salina (0,9%, 40 µl, s.c.), apitoxina (0,1 mg/Kg, s.c.), apitoxina (1,2 mg/Kg, s.c.), haloperidol (0,2 mg/Kg; i.p.), haloperidol/ apitoxina 0,1 mg/Kg, haloperidol/ apitoxina 1,2 mg/Kg e diazepam (1 mg/Kg; i.p.), com n = 5 animais por grupo, conforme quadro 1.

Quadro 1: Classificação da amostra.

Grupo (n=5)	Tratamento subcutâneo
G1	Solução Salina (0,9%, 40µl)
G2	Apitoxina (0,1 mg/Kg)
G3	Apitoxina (1,2 mg/Kg)
G4	Haloperidol (0,2 mg/Kg)
G5	Haloperidol/ Apitoxina (0,1 mg/Kg)
G6	Haloperidol/ Apitoxina (1,2 mg/Kg)
G7	Diazepam (1mg/Kg)

2.3 Drogas

Diazepam (1 mg/Kg, União Química Farmacêutica Nacional S.A., São Paulo, Brasil), Apomorfina (20 mg/Kg, Sigma, São Paulo, Brasil), Haloperidol (0,2 mg/Kg, Janssen-Cilag Farmacêutica, São Paulo, Brasil). A apitoxina foi adquirida em maio de 2012, proveniente da região de São Roque (São Paulo, Brasil).

2.4 Desenho experimental

Animais receberam apitoxina diluída em salina (0,9%) nas concentrações 0,1 mg/Kg ou 1,2 mg/Kg, de acordo com o grupo a que pertenciam. Controles receberam solução salina (0,9%, 40µl). Nos grupos que receberam haloperidol e apitoxina, primeiro foi injetado o haloperidol (i.p.) e após 30 minutos injetou-se a apitoxina (s.c.). Foram realizados os testes de catalepsia, campo aberto, estereotípias induzidas por apomorfina e labirinto em cruz elevado, respeitando-se o tempo de 30 minutos para o início das avaliações, exceto para o teste de estereotípias induzidas por apomorfina, que teve início logo após a aplicação da apomorfina. Todos os testes foram registrados em vídeo para posterior quantificação.

2.4.1 Teste de catalepsia:

O teste de catalepsia é caracterizado pela imobilidade do animal ou pela dificuldade do mesmo em corrigir posturas impostas (SANBERG et al., 1988), sintomas semelhantes à catatonia. Neste teste cada camundongo foi colocado com ambas as patas anteriores sobre uma barra horizontal (diâmetro de 0,5 cm), elevada 4,5 cm do solo. O tempo em segundos, durante o qual o animal permaneceu nesta posição foi registrado em vídeo, até um tempo máximo de 300 segundos, de modo que foram permitidas três tentativas de colocação do animal em posição cataléptica. O teste de catalepsia foi considerado finalizado quando as patas anteriores tocaram o solo ou quando o animal subiu na barra. Participaram deste teste os grupos: salina/ salina, salina/ apitoxina (0,1 mg/Kg), salina/ apitoxina (1,2 mg/Kg), haloperidol/ apitoxina 0,1 mg/Kg, haloperidol/ apitoxina 1,2 mg/Kg e haloperidol/ salina.

2.4.2 Teste do campo aberto:

O teste de campo aberto pode ser utilizado para avaliação da atividade motora e do estado emocional dos animais (WHIMBEY; DENENBERG, 1967) por meio da análise de

comportamentos expressados ao se colocar um animal em espaço aberto novo, onde a fuga do mesmo é evitada pelas paredes que o circundam. Os parâmetros avaliados foram: (1) a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as quatro patas - *crossings*), (2) exploração vertical (manutenção do animal apenas sobre as patas posteriores - *rearing*), (3) número de bolos fecais expelidos e (4) comportamentos de autolimpeza (*grooming*) executados.

O equipamento de madeira, recoberto de fórmica na cor branca, consiste num quadrilátero com 4830,25 cm² de área e paredes com 34,5 cm de altura, cuja base é subdividida em dezesseis quadrantes. Entre o teste de um animal e outro, o equipamento foi limpo com álcool 20% para evitar a influência do cheiro de outros animais. Cada teste teve duração de cinco minutos. Participaram deste teste os grupos: salina, apitoxina (0,1 mg/Kg), apitoxina (1,2 mg/Kg), haloperidol/ apitoxina 0,1 mg/Kg, haloperidol/ apitoxina 1,2 mg/Kg e haloperidol.

2.4.3 Estereotipias induzidas por apomorfina

O comportamento estereotipado foi quantificado através da escala de escores proposta por Setler et al. (1976), que atribui valores crescentes aos parâmetros comportamentais exibidos pelos animais após a aplicação de apomorfina. Cada animal foi observado durante 10 segundos, a intervalos de 10 minutos, durante 60 minutos consecutivos, medidos a partir da administração do agonista dopaminérgico para atribuição dos escores. Participaram deste teste os grupos: salina, apitoxina (0,1 mg/Kg) e apitoxina (1,2 mg/Kg), que receberam apomorfina (20 mg/Kg; i.p.) 30 minutos após a administração de salina ou apitoxina, de acordo com o grupo a que pertenciam.

2.4.4 Labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado é utilizado para avaliar condições de medo e ansiedade. O aparato possui uma base que o eleva a 45 cm de altura do solo. É constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados do mesmo tamanho, com paredes de 40 cm de altura e descobertos na parte superior. Neste teste, o animal é colocado no centro do labirinto em cruz elevado com a face voltada para o braço aberto. Foi analisado o número de entradas e tempo de permanência do animal nos braços abertos e fechados (PELLOW et al., 1985) durante 5 minutos. Participaram do teste os grupos: salina, apitoxina (0,1 mg/Kg), apitoxina (1,2 mg/Kg) e diazepam (1 mg/Kg; i.p.).

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram previamente submetidos ao teste de Kolmogorov e Smirnov para avaliação da normalidade de dados. Considerando que as amostras apresentaram distribuição Gaussiana, os resultados dos testes comportamentais foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey para comparações entre os tratamentos.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os graus de liberdade foram expressos por F e os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Para tanto foi utilizado o programa SPSS versão 19.0.

3. RESULTADOS

3.1 Teste de catalepsia

A análise estatística revelou interação significativa entre os tratamentos ($F_{4,68}=6,61$; $P = 0,0002$; ANOVA), conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Efeitos da apitoxina no teste de catalepsia em camundongos.

Tratamento (s.c.)	Dose (mg/Kg)	Catalepsia (s)	Valor de p (Tukey)
Salina	----	0.0	---
Apitoxina	0,1	$2,53 \pm 0,59$	---
Apitoxina	1,2	$87,72 \pm 20,64$	0,04a
			0,05b
Haloperidol	0,2	$75,75 \pm 28,84$	0,04a
			0,05b
Haloperidol/Apitoxina	0,1	$92,58 \pm 16,69$	0,007a
			0,04b
Haloperidol/Apitoxina	1,2	$3,33 \pm 0,59$	---

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. “a” indica valor de p em comparação com o grupo apitoxina (0,1 mg/kg) e “b” indica valor de p em comparação com o grupo apitoxina (1,2 mg/kg/haloperidol). [n = 5-8 por grupo; análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey].

O pós-teste mostrou que a administração aguda de apitoxina induziu atividade cataléptica apenas quando administrada a maior dose (1,2 mg/kg; $p = 0,04$ em relação ao grupo apitoxina 0,1 mg/kg), sendo este efeito semelhante ao do haloperidol ($p = 0,04$ em relação ao grupo apitoxina 0,1 mg/kg). Adicionalmente, quando administrados em conjunto (haloperidol + apitoxina 1,2 mg/kg), ocorreu diminuição do tempo de catalepsia em relação aos grupos que receberam apenas apitoxina 1,2 mg/kg ($p = 0,09$) ou haloperidol ($p = 0,05$).

Em contraste, a menor dose de apitoxina (0,1 mg/kg) não mostrou modificação significativa quando associada ao tratamento com haloperidol ($p = 0,07$ quando comparados apitoxina 0,1 mg/kg + haloperidol versus haloperidol), e apresentou os menores valores em relação ao tempo de permanência na barra, diferindo significativamente dos demais grupos ($p = 0,007$ em relação ao tratamento apitoxina 0,1 mg/kg + haloperidol e $p = 0,04$ em relação ao grupo apitoxina 1,2 mg/kg + haloperidol).

Os animais que receberam solução salina não permaneceram na barra e dessa forma não foram considerados para análise estatística (valores iguais a zero).

3.2 Teste de campo aberto

A administração de apitoxina na dose de 1,2 mg/kg promoveu redução significativa no número de explorações horizontais, o mesmo ocorrendo após a administração de haloperidol (ambos com $p < 0,0001$ quando comparados com salina). Esta mesma dose induziu diminuição em relação aos demais grupos ($p < 0,0001$ quando comparado ao grupo apitoxina 0,1 mg/kg e $p = 0,001$ em relação ao grupo apitoxina 0,1 mg/kg + haloperidol), à exceção do grupo tratado com haloperidol ($p = 0,90$) e, adicionalmente, o efeito da administração de apitoxina na dose 1,2 mg/kg foi modificado quando precedido do tratamento com haloperidol ($p = 0,02$ entre apitoxina 1,2 mg/kg e apitoxina 1,2 mg/kg + haloperidol). Os dados podem ser observados na Figura 1A (ANOVA, $F_{5,28} = 12,32$; $p < 0,0001$).

A dose de apitoxina 0,1 mg/kg, não promoveu alterações significativas em relação aos grupos tratados com salina ($p = 0,80$) ou apitoxina 1,2 mg/kg + haloperidol ($p = 0,63$). Também não foram observadas modificações pelo pré-tratamento com haloperidol ($p = 1,00$ quando comparado com apitoxina 0,1 mg/kg + haloperidol).

Quando analisadas as explorações verticais ($F_{5,28} = 9,93$; $p < 0,0001$, ANOVA), ambas as doses de apitoxina bem como o tratamento com haloperidol mostraram redução significativa em relação aos controles ($p = 0,001$ e $p = 0,001$) e ao grupo tratado com haloperidol + apitoxina 1,2 mg/kg ($p = 0,009$ e $p = 0,007$, respectivamente, para as doses de 0,1 e 1,2 mg/kg; Figura 1B). Ainda, houve aumento significativo do comportamento de

autolimpeza no grupo apitoxina 1,2 mg/kg em relação ao grupo salina ($F_{5,28} = 3,33$; $p = 0,021$: ANOVA; $p = 0,014$: Tukey).

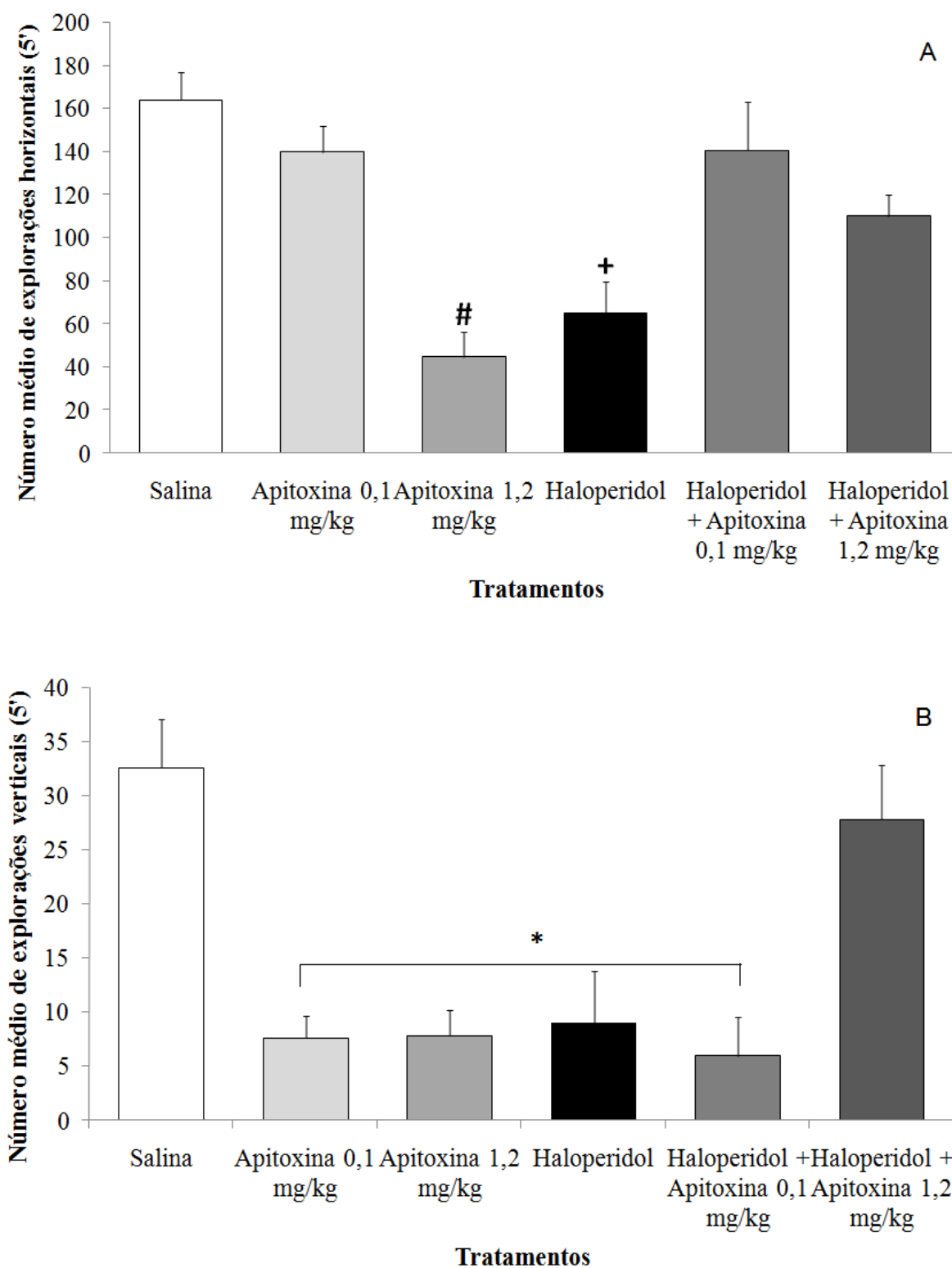


Figura 1: Efeitos da apitoxina e do haloperidol no teste de campo aberto no que se refere aos comportamentos de exploração horizontal (A) e exploração vertical (B). O teste foi realizado 30 min após injeção subcutânea (s.c.) de apitoxina (0,1 e 1,2 mg/kg), salina (40 µl)

ou haloperidol (0,2 mg/kg). Ambos, apitoxina e haloperidol, promoveram redução do número de explorações horizontais e verticais, e o pré-tratamento com haloperidol modificou os efeitos da apitoxina (1,2 mg/kg). As barras representam as médias $\pm$ erro padrão da média dos comportamentos, que foram expressos em 5 min. #: diferença significativa em relação aos outros grupos, exceto haloperidol [$p < 0,0001$ comparado com salina e apitoxina (0,1 mg/kg), $p = 0,001$ comparado com apitoxina (0,1 mg/kg/haloperidol), e $p = 0,018$ comparado a apitoxina (1,2 mg/kg/haloperidol)]. +: diferença significativa em relação aos outros grupos e apitoxina (1,2 mg/kg) + haloperidol [$p = 0,001$ comparado com salina; $p = 0,014$ comparado a apitoxina (0,1 mg/kg), e $p = 0,019$ comparado a apitoxina (1,2 mg/kg/haloperidol)]. * Indica diferença significativa quando comparado com todos os outros grupos. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, $n = 5$).

3.3 Avaliação das estereotipias induzidas por apomorfina

Os resultados obtidos evidenciaram diminuição significativa nas estereotipias induzidas por apomorfina, quando ambas as doses de apitoxina foram pré-administradas ($F_{2,23} = 4,12$; $p = 0,032$: ANOVA seguida do pós-teste de Tukey). No entanto, não foram observados efeitos dose dependentes ($p = 0,82$). Os resultados podem ser observados na Figura 2.

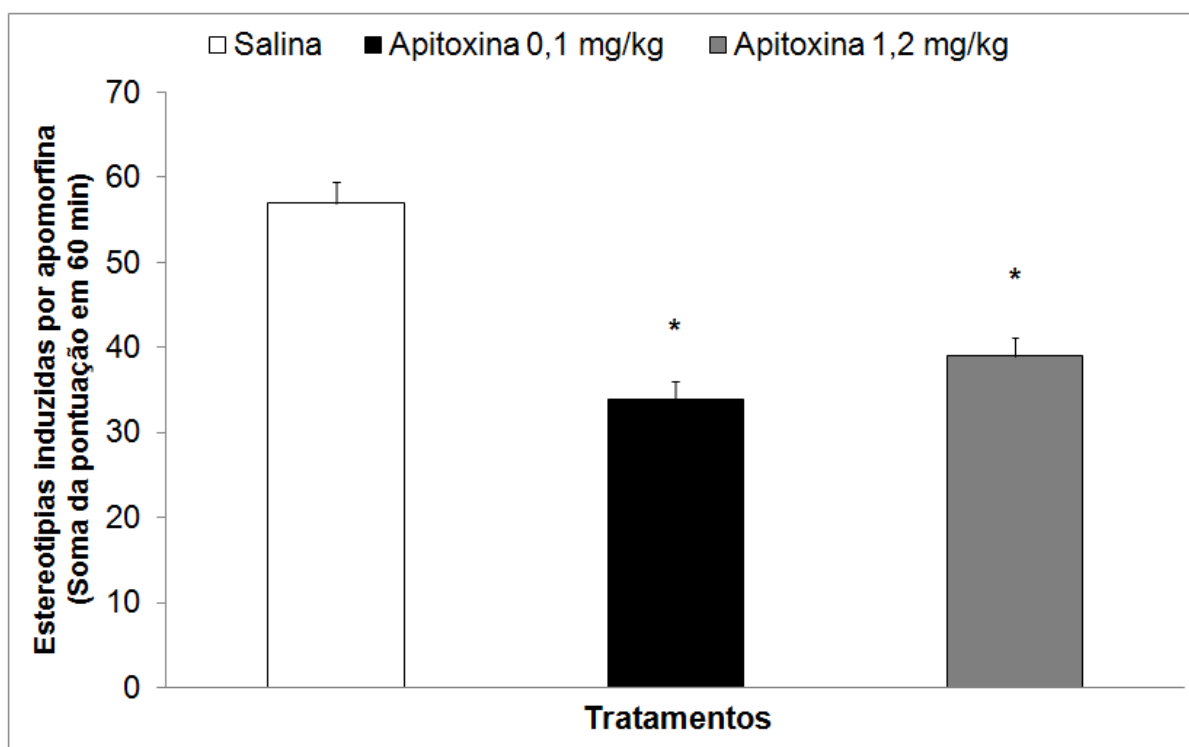


Figura 2: Tratamento agudo com apitoxina [0,1 mg/kg (preto) e 1,2 mg/kg (cinza)] na redução do comportamento de estereotipias induzidas por apomorfina em camundongos. Apitoxina ou salina (40 μ l, coluna branca) foi administrada 30 min antes da apomorfina (20 mg/kg, s.c.), e as medidas foram feitas por 10 s em intervalos de 10 min durante 60 min. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média no tempo de 10 s. * indica

as diferenças em relação ao grupo salina (ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey, $n = 4-5$).

3.4 Teste de labirinto em cruz elevado

O tratamento agudo com apitoxina não promoveu efeitos significativos na avaliação de atividade ansiolítica no labirinto em cruz elevado (Tabela 2). Não foram observadas modificações no tempo de permanência nos braços abertos ($F_{3,37} = 1,44$; $p = 0,25$; ANOVA) entre os grupos. Apenas a administração de diazepam aumentou significativamente o número de entradas nos braços abertos ($F_{3,32} = 9,47$; $p = 0,005$; ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey).

Tabela 2: Efeitos da apitoxina no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos.

Tratamento	Doses (mg/Kg)	Número médio de entradas nos braços abertos (5 min)	Tempo médio gasto nos braços abertos (s)
Salina	----	$5,2 \pm 1,1$	$93,5 \pm 12,8$
Apitoxina	0,1	$9,1 \pm 1,6$	$118,5 \pm 16,3$
Apitoxina	1,2	$4,4 \pm 1,0$	$110,0 \pm 23,6$
Diazepam	1,0	$11,1 \pm 1,3^*$	$136,3 \pm 13,4$

(*) $p < 0,05$ em relação ao tratamento com salina [40 μ l, subcutâneo (s.c.)]. ANOVA One-way seguido do pós-teste de Tukey ($n = 5-10$).

4. DISCUSSÃO

Avaliação comportamental tem sido utilizada para verificar o efeito de drogas e fármacos, incluindo produtos naturais, sobre o sistema nervoso central. Até o momento, os trabalhos na literatura investigaram os efeitos da apitoxina sobre os comportamentos relacionados à dor e inflamação (MERLO *et al.*, 2011; ROH *et al.*, 2006) e na prevenção de vício induzido por anfetamina (KWON *et al.*, 2010), além de um possível efeito neuroprotetor (LEE *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011a; DOO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010).

Os resultados dos testes comportamentais neste trabalho mostraram que a apitoxina induziu catalepsia em roedores, diminuiu as estereotípias induzidas por apomorfina e alterou parâmetros associados à atividade motora no teste de campo aberto. Estes efeitos foram

similares às ações descritas para o neuroléptico haloperidol e, em adição, houve interação quando do tratamento conjunto com apitoxina e haloperidol.

Observou-se que a maior dose de apitoxina (1,2 mg/kg) induziu catalepsia trinta minutos após a aplicação aguda. A catalepsia, definida como uma postura imposta em roedores, é relacionada à ocupação de receptores dopaminérgicos no estriado, sendo que a catalepsia induzida pelo haloperidol é caracterizada pela ocupação de receptores D2 (SANBERG, 1980). Quando os tratamentos foram associados, o tempo de permanência na barra foi significativamente reduzido, o que pode sugerir que tenha ocorrido ocupação destes receptores dopaminérgicos pela apitoxina, de maneira competitiva com o haloperidol.

Pelo menos dois componentes presentes na apitoxina têm sido relacionados à transmissão dopaminérgica, a melitina e a apamina. Keith et al. (2011) demonstraram, utilizando cultura de células transfectadas com cDNA para expressão recombinante de transportador de dopamina (DAT) e também do receptor dopaminérgico D2, que a melitina diminuiu a captação de dopamina agindo diretamente no DAT e também inibiu a ligação do receptor D2 com antagonista [³H]spiperone. Este último dado é coerente com o achado comportamental do presente trabalho em que a administração de apitoxina e haloperidol resultou na reversão do efeito cataléptico e pode indicar que princípios ativos da apitoxina possam mediar a catalepsia induzida pela ocupação dos receptores D2 pré-sinápticos.

Outro peptídeo presente no veneno, a apamina, atua como bloqueador de canais de K⁺ ativados por Ca⁺⁺ e pode causar o aumento da atividade de neurônios dopaminérgicos, que normalmente seriam hiperpolarizados por aumento da condutância ao K⁺ via receptores D2 (VANDECASTEELE *et al.*, 2011). Steketee e Kalivas (1990) realizaram a microinjeção de apamina diretamente no núcleo acumbens de ratos e observaram aumento da atividade motora e dos níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos, após o tratamento agudo. O efeito comportamental foi distinto do observado no teste de campo aberto no presente trabalho em que a administração subcutânea resultou em diminuição da atividade motora, mas vale ressaltar que os autores também observaram reversão pelo pré-tratamento com haloperidol. Ainda, cabe considerar que o efeito de um componente isolado pode ser distinto da ação conjugada promovida por diversos princípios ativos quando administrada apitoxina. A própria dopamina pode ser encontrada entre os componentes do veneno de abelhas (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988).

Em estudo realizado por Kim et al. (2004), frações mínimas (0,2 µg/Kg e 3 µg/Kg) de apitoxina, injetadas via subcutânea, com diferentes pesos moleculares, foram testadas em camundongos e não produziram alterações motoras funcionais ou qualquer efeito significativo sobre o sistema nervoso central. Em contrapartida, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a apitoxina (1,2 mg/kg) foi capaz de diminuir a locomoção, a exploração e o *grooming* no teste de campo aberto. Em adição, os efeitos motores foram

revertidos pelo pré-tratamento com haloperidol, assim como observado no teste de catalepsia. Trabalhos anteriores sugerem que o aumento na atividade motora espontânea no campo aberto possa ser mediado por receptores D2 (ZUO *et al.*, 2008), enquanto os receptores D1 estariam envolvidos com o *grooming* (DRAGO *et al.*, 1999). Dessa forma, os resultados apontam para uma interação da apitoxina com o sistema dopaminérgico e sugerem que sua ação pode não estar restrita aos receptores D2, mas à ação sinérgica dos diferentes receptores e respectivas vias de sinalização celular.

Em concordância com esta hipótese, os resultados mostraram redução das estereotipias induzidas por apomorfina após tratamento agudo com ambas as doses de apitoxina. As estereotipias resultam da interação da apomorfina com receptores dopaminérgicos (RANDRUP; MUNKVAD, 1974) e o teste é frequentemente utilizado para avaliar propriedades antipsicóticas de drogas. A atividade antipsicótica representaria uma possibilidade terapêutica inédita para a apitoxina, já que não há relatos na literatura de interações entre a apitoxina ou seus componentes com os efeitos promovidos pela apomorfina. Neste sentido, os efeitos encontrados nos demais testes foram semelhantes ao do haloperidol, um neuroléptico clássico.

Alguns achados na literatura sugerem que a apamina possa modificar a atividade de núcleos envolvidos no comportamento afetivo, como *lócus coeruleus* (OSMANOVIC *et al.*, 1990) e que a melitina aumenta os níveis de cortisol em resposta ao estresse (DUNN; KILLION, 1988). Assim, para investigar um possível efeito sobre a ansiedade, os camundongos foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, exceto e como esperado, o efeito do diazepam em aumentar o número de entradas nos braços abertos.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, a administração aguda de apitoxina na dose de 1,2 mg/kg reduziu a atividade motora, o *grooming*, as estereotipias induzidas por apomorfina e promoveu efeito cataléptico, de maneira análoga ao haloperidol. Estes efeitos foram diminuídos pelo pré-tratamento com haloperidol, sugerindo ação antipsicótica da apitoxina, possivelmente pela interação com receptores dopaminérgicos. No entanto, mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos de ação, incluindo novos testes comportamentais, por exemplo, para investigação de efeito depressor e das regiões cerebrais envolvidas.

6. REFERÊNCIAS

CHO, S-Y.; SHIM, S-R.; RHEE, H. Y.; PARK, H-J.; JUNG, W-S.; MOON, S-K.; PARK, J-M.; KO, C-N.; CHO, K-H.; PARK, S-U. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 8, p. 948-952, 2012.

CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.

DOO, A-R.; KIM, S. T.; KIM, S-N; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010. Supplement 1.

DOO, A. R.; KIM, S. N.; KIM, S. T.; PARK, J. Y.; CHUNG, S. H.; CHOE, B. Y.; CHAE, Y.; LEE, H.; YIN, C. S.; PARK, H. J. Bee venom protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death. **Brain Research**, v. 1429, p. 106-115, 2012.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSÀ, L. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 125-131, 1999.

DUNN, J. D.; KILLION, J. J. Effect of melittin on pituitary-adrenal responsiveness to stress. **Acta Endocrinologica**, v. 119, n. 3, p. 339-344, 1988.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. **Toxicon**, v.56, n. 3, p. 355-362, 2010.

HAN, S; LEE, K; YEO, J.; KIM, W.; PARK, K. Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 3, p. 67-72, 2011.

HIDER, R. C. HONEYBEE VENOM: A rich source of pharmacologically active peptides. **Endeavour, New Series**, v. 12, n. 2, p. 60-65, 1988.

KEITH, D. J.; ESHLEMAN, A. J.; JANOWSKY, A. Melittin stimulates fatty acid release through non-phospholipase-mediated mechanisms and interacts with the dopamine

transporter and other membrane-spanning proteins. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 501-510, 2011.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209-217, 2011a.

KIM, K. W.; KIM, H. W.; LI, J.; KWON, Y. B. Effect of bee venom acupuncture on methamphetamine-induced hyperactivity, hyperthermia and Fos expression in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 84, n. 1, p. 61-68, 2011b.

KIM, H-W.; KWON, Y-B.; HAM, T-W.; ROH, D. H.; YOON, S-Y.; KANG, S-Y., YANG, I-S.; HAN, H-J.; LEE, H-J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. General pharmacological profiles of bee venom and its water soluble fractions in rodent models. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 4, p. 309-318, 2004.

KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAM, T. W.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; LEE, H. J.; HAN, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. **The Journal of veterinary medical science**, v. 65, n. 3, p. 349-355, 2003.

KWON, Y. B.; LI, J.; KOOK, J. A.; KIM, T. W.; JEONG, Y. C.; FILHO, J. S.; LEE, H.; KIM, K. W.; LEE, J. H. Bee venom suppresses methamphetamine-induced conditioned place preference in mice. **Neurological research**, v. 32, p. 101-106, 2010. Suplemento 1.

KWON, Y. B.; HAN, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Bee venom acupoint stimulation increases Fos expression in catecholaminergic neurons in the rat brain. **Molecules and Cells**, v. 17, n. 2, p. 329-333, 2004.

LEE, W.R.; KIM, S.J.; PARK, J.H.; KIM, K. H.; CHANG, Y. C.; PARK, Y. Y.; LEE, K. G.; HAN, S. M.; YEO, J. H.; PAK, S. C.; PARK, K. K. Bee venom reduces atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory mechanism. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1077-1092, 2010.

LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 368196 p. 1-9, 2012.

MERLO, L. A.; BASTOS, L. F.; GODIN, A. M.; ROCHA, L. T.; NASCIMENTO, E. B. JR.; PAIVA, A. L.; MORAES-SANTOS, T.; ZUMPANO, A. A.; BASTOS, E. M.; HENEINE, L. G.; COELHO, M. M. Effects induced by *Apis mellifera* venom and its components in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 764-771, 2011.

MOON, D. O.; PARK, S. Y.; LEE, K. J.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; KIM, M. O.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 8, p. 1092–1101, 2007.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 173-194, 2011.

OSMANOVIĆ, S. S.; SHEFNER, S. A.; BRODIE, M. S. Functional significance of the apamin-sensitive conductance in rat locus coeruleus neurons. **Brain Research**, v. 530, n. 2, p. 283-289, 1990.

PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, S. J.; LEE, W. R.; LEE, K. G.; PARK, K. K. Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- α and actinomycin D. **Archives Pharmacal Research**, v. 33, n. 2, p. 215-223, 2010.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

RANDRUP, A.; MUNKVAD, I. Pharmacology and physiology of stereotyped behavior. **Journal of Psychiatric Research**, v. 11, p. 1-10, 1974.

ROH, D. H.; KIM, H. W.; YOON, S. Y.; KANG, S. Y.; KWON, Y. B.; CHO, K. H.; HAN, H. J.; RYU, Y. H.; CHOI, S. M.; LEE, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Bee venom injection significantly reduces nociceptive behavior in the mouse formalin test via capsaicin-insensitive afferents. **The Journal of Pain: Official journal of the American Pain Society**, v. 7, n. 7, p. 500-512, 2006.

SANBERG, P. R. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. **Nature**, v. 284, n. 5755, p. 472- 473, 1980.

SANBERG, P. R.; BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M.; NORMAN, A. B. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748-59, 1988.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA-JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 117-126, 1976.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H.; S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246–270, 2007.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Effect of microinjections of apamin into the A10 dopamine region of rats: a behavioral and neurochemical analysis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 254, n. 2, p. 711-719, 1990.

VANDECASTEELE, M.; DENIAU, J. M.; VENANCE, L. Spike frequency adaptation is developmentally regulated in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons. **Neuroscience**, v. 192, p. 1-10, 2011.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-504, 1967.

YANG, E. J.; JIANG, J. H.; LEE, S. M.; YANG, S. C.; HWANG, H. S.; LEE, M. S.; CHOI, S. M. Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 69, 2010.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011.

ZUO, J.; LIU, Z.; OUYANG, X.; LIU, H.; HAO, Y.; XU, L.; LU, X. H. Distinct neurobehavioral consequences of prenatal exposure to sulpiride (SUL) and risperidone (RIS) in rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, n. 2, p. 387-397, 2008.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA APITOXINA EM
MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON.**

Camila Gomes Dantas, Tássia Luiza Gonçalves Magalhães Nunes,
Ailma Oliveira Paixão, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior,
Kátia Peres Gramacho, Margarete Zanardo Gomes.

Universidade Tiradentes (UNIT) - departamento de Pós-Graduação -
Aracaju/SE.

Endereço para correspondência:

Avenida Murilo Dantas, nº 300, Farolândia, Aracaju/ Sergipe.

CEP: 49032-490

Tel.: (79) 3218-2100

E-mail: guetezanardo@yahoo.com.br

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos (DA) na substância negra compacta (SNc). Abelhas do gênero *Apis* apresentam veneno composto por uma complexa mistura de enzimas, peptídeos e aminoácidos e apresenta efeitos neuroprotetor e antiinflamatório, descritos na literatura. No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito do tratamento com veneno de abelha, a apitoxina, e seu principal componente, melitina, na progressão da morte neuronal após aplicação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), modelo experimental da DP. Para tanto, camundongos suíços, machos, com massa corporal aproximada de 25 a 30g, foram submetidos à cirurgia estereotáxica, onde receberam micro-injeção intra estriatal da neurotoxina 6-OHDA ou do veículo. A apitoxina (0,1; 0,6 e 1,2 mg/kg) e a melitina (0,2 mg/kg) foram administradas (s.c.) durante três semanas consecutivas à cirurgia, uma vez a cada dois dias. Os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (avaliação das explorações horizontais, verticais e *grooming*) e comportamento rotatório 30 dias após a lesão. Os dados foram analisados através do teste análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Duncan, ($p < 0,05$), sendo considerado variável o fator tratamento. No teste campo do aberto, os grupos 6-OHDA/ salina e 6-OHDA/ apitoxina (0,6 mg/Kg) apresentaram diminuição significativa nas explorações horizontais (EH) ($p = 0,010$). Por outro lado, este efeito foi revertido nos grupos que receberam 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/ Kg) e 6-OHDA/ melitina. Nas explorações verticais (EV), os grupos 6-OHDA/ salina e 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/ Kg) apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo controle (salina/ salina) ($p = 0,05$). No que se refere ao *grooming*, o grupo 6-OHDA/ apitoxina (1,2 mg/ Kg) apresentou elevação com tendência significativa ($p = 0,06$) em relação aos grupos salina/ apitoxina (0,1 mg/ Kg), salina/ apitoxina (1,2 mg/ Kg), 6-OHDA/ salina, 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/ Kg) e 6-OHDA/ apitoxina (0,6 mg/ Kg). No teste de comportamento rotatório, o grupo 6-OHDA/ salina, realizou média de 70 rotações, enquanto o grupo 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/ Kg), teve o número de giros reduzido a zero. Animais que receberam 6-OHDA/ melitina, apresentaram média de 348 rotações. Os resultados sugerem, portanto, efeito neuroprotetor da apitoxina no modelo experimental da DP e possível toxicidade da melitina quando administrada de forma isolada.

Palavras-chave: doença de Parkinson; *Apis mellifera* e melitina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Apitoxin, the bee venom from *Apis mellifera* is composed by a complex mixture of enzymes, peptides and amino acids and presents anti-inflammatory and neuroprotective effects. The aim of the present study was to evaluate the effects of the apitoxin, and its main compound, melitin, in the neuronal loss after the injection of 6-hidroxydopamine (6-OHDA), an experimental model of PD. Male swiss mice, weighting 25 g to 30 g, were subjected to stereotaxic surgery, and received an intrastriatal 6-OHDA or vehicle microinjection. Apitoxin (0.1; 0.6 and 1.2 mg/kg) or melitin (0.2 mg/Kg) were administered (s.c.) every other day over three consecutive weeks after surgery. The open field (crossing, rearing and *grooming*) and rotational behavior tests were performed 30 days after the lesion. Data were analyzed by one way ANOVA, followed by Duncan's post-test, ($p < 0.05$), factor being treatment. Evaluation of the open field test, revealed that the 6-OHDA/ vehicle and 6-OHDA/ apitoxin (0.6 mg/Kg) groups showed significant decrease in crossings ($p = 0,010$). On the other hand, this effect was reversed in the 6-OHDA/ apitoxin (0.1 mg/Kg) and 6-OHDA/ melitin groups. Significant decrease in rearing was observed in the 6-OHDA/ vehicle and 6-OHDA/ apitoxin (0.1 mg/Kg) relative to the control group (saline/ vehicle) ($p = 0.05$). The mean of *grooming* behavior was greater in, the group 6-OHDA/ apitoxin (1.2 mg/Kg) ($p = 0.06$) from groups saline/ apitoxin (0.1 mg/Kg), saline/ apitoxin (1.2 mg/Kg), 6-OHDA/ vehicle, 6-OHDA/ apitoxin (0.1 mg/Kg) and 6-OHDA/ apitoxin (0.6 mg/Kg). The group 6-OHDA/ vehicle, presented a mean of 70 rotations, while the 6-OHDA/ apitoxin (0.1 mg/Kg) group did not performed rotations. Animals receiving 6-OHDA/ melitin, showed an average of 348 rotations. The results suggest, therefore, neuroprotective effect of apitoxin in the experimental model of PD and a possible toxicity of melittin when administered alone.

Keywords: Parkinson's disease; *Apis mellifera* and melitin.

1. INTRODUÇÃO

Considerada uma doença neurodegenerativa progressiva e incapacitante (CHUNG *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2009; GALTER, 2008) e identificada como a segunda mais freqüente depois da doença de Alzheimer (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; MUANGPAISAN *et al.*, 2011; SHAPIRA *et al.*, 2009; LAU; BRETELER, 2006), a doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda contínua e expressiva (maior que 80%) de neurônios dopaminérgicos (DA) na parte compacta da substância negra, implicando na redução de dopamina na via nigro-estriatal (CHUNG *et al.*, 2012; WICHMANN; DOSTROVSKY, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RIZELIO *et al.*, 2010; LANE; DUNNETT, 2008; LEW, 2007; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS *et al.*, 2002). A sintomatologia clássica consiste em tremor, rigidez muscular, instabilidade postural (MUANGPAISAN *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RIZELIO *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2010), bradicinesia (CHUNG *et al.*, 2012; HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011), acinesia e fácies amímica (HEISTERS, 2011; WIRDEFELDT *et al.*, 2011) e as repercussões desta desordem no organismo comprometem sobremaneira a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Os tratamentos farmacológicos disponíveis têm como objetivo restaurar a atividade dopaminérgica para melhorar a mobilidade funcional (HEISTERS, 2011), contudo, apesar dos esforços científicos em prol de terapêuticas mais eficazes para conter a doença, os tratamentos disponíveis são apenas sintomáticos (KOLLER, 2002). O precursor dopaminérgico di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) consiste no principal medicamento recomendado para a enfermidade (HEISTERS, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; RAO; HOFMANN; SHAKIL, 2006), no entanto, após cerca de cinco anos de uso contínuo, os efeitos colaterais incômodos se desenvolvem na forma de flutuações nas respostas motoras e discinesias, que atingem mais de 80% dos pacientes tratados, sendo considerado o conjunto mais debilitante de complicações motoras que surgem após longo período de uso da droga (YOKOYAMA *et al.*, 2011; RAO; HOFMANN; SHAKIL, 2006; CENCI; LEE; BJORKLUND, 1998; MARSDEN, 1994).

Dessa maneira é de extrema importância que questões que envolvam a progressão da DP e soluções terapêuticas para os problemas que aparecem durante o tratamento sintomático, sejam abordadas. Neste contexto, a apitoxina, e seu principal componente, melitina, configuram-se como potenciais produtos a serem explorados no intuito de promover possíveis benefícios para indivíduos acometidos por esta enfermidade (CHO *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011a; DOO *et al.*, 2010).

A apitoxina é o veneno produzido pelas abelhas e consiste numa mistura complexa de enzimas (KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010;

PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988), peptídeos (MATYSIAK *et al.*, 2011; KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; PACÁKOVÁ; STULÍK, 2000; HIDER, 1988) e aminoácidos (ZHOU *et al.*, 2010; HIDER, 1988), além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios (HIDER, 1988). Dentre as substâncias que compõem a apitoxina produzida pelas abelhas do gênero *Apis*, destaca-se a melitina, que equivale a 50% do peso seco do veneno (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010) e apresenta importante propriedade antiinflamatória (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), antibacteriana e antifúngica (YANG *et al.*, 2011), e largo espectro de ação (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010; BOGAART *et al.*, 2008).

Neste contexto, Lee *et al.* (2012) identificaram que a apitoxina reduz a toxicidade glutamatérgica de células neuronais e microgliais e age sobre as vias de sinalização, protegendo contra a morte celular característica de desordens neurodegenerativas. No que concerne aos mecanismos neuroinflamatórios que permeiam estas enfermidades, estudos identificaram que a apitoxina possui potente efeito supressor sobre respostas pró-inflamatórias por suprimir a transcrição gênica da cicloxigenase e citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (CHEN; LARIVIERE, 2010; MOON; PARK; LEE, 2007; NAM *et al.*, 2003).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com veneno de abelhas e seu principal componente, melitina, sobre a recuperação funcional motora e a gravidade da lesão após aplicação de 6-OHDA em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Submissão do estudo ao Comitê de Ética e Pesquisa

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Tiradentes, em 10 de maio de 2011, e aprovado mediante protocolo nº.050511. Todos os procedimentos ocorreram em conformidade com as normas do COBEA.

2.2 Amostra

A amostra deste estudo foi composta de 45 camundongos suíços, machos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximada de 25 a 30g. Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de (22°C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas e água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). Os grupos experimentais foram assim definidos: solução salina/ solução salina; solução salina/ apitoxina 0,1 mg/Kg; solução salina/ apitoxina 0,6 mg/Kg; solução salina/ apitoxina 1,2 mg/Kg; 6-OHDA/ solução salina; 6-OHDA/ apitoxina 0,1 mg/Kg; 6-OHDA/ apitoxina 0,6 mg/Kg; 6-OHDA/ apitoxina 1,2 mg/Kg; 6-OHDA/ melitina 0,2 mg/Kg (n = 5 animais por grupo, total de 45, considerando as doses – Quadro 1) referindo-se respectivamente à micro-injeção intra estriatal e à administração subcutânea.

Quadro 1: Classificação da amostra.

Grupo (n=5)	Tratamento intracerebral	Tratamento subcutâneo
G1	Solução Salina	Solução Salina (40µl)
G2	Solução Salina	Apitoxina (0,1 mg/Kg)
G3	Solução Salina	Apitoxina (0,6 mg/Kg)
G4	Solução Salina	Apitoxina (1,2 mg/Kg)
G5	6-OHDA	Solução Salina (40µl)
G6	6-OHDA	Apitoxina (0,1 mg/Kg)
G7	6-OHDA	Apitoxina (0,6 mg/Kg)
G8	6-OHDA	Apitoxina (1,2 mg/Kg)
G9	6-OHDA	Melitina (0,2 mg/Kg)

2.3 Obtenção dos compostos

A apitoxina foi adquirida em maio de 2012, proveniente da região de São Roque (São Paulo, Brasil). A melitina foi obtida em maio de 2012 da Sigma (São Paulo, Brasil) e a 6-OHDA e apomorfina foram adquiridos da Sigma (São Paulo, Brasil) em 2010.

2.4 Indução da lesão por 6 – OHDA

A lesão progressiva da via nigro-estriatal foi causada pela aplicação intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos. A injeção intra-cerebral de 6-OHDA ou solução salina contendo 0.02% de ácido ascórbico foi realizada por meio de cirurgia estereotática.

Os animais destinados ao experimento foram anestesiados previamente com ketamina/ xilazina (150 e 15mg/kg, respectivamente, i.p.). Após anestesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotático (Insight ®, Brasil) com a fixação dos ossos temporais e aparelho mandibular e foi administrada injeção subcutânea na região dorsal da cabeça de 0,02 mL de lidocaína 3% contendo epinefrina a 2%.

Os parâmetros utilizados (lado direito) para micro-injeção de 6-OHDA foram obtidos de acordo com Heuer et al. (2012) e Francardo et al. (2011), nas seguintes coordenadas (em mm em relação ao bregma, sutura sagital e da superfície dural): duas injeções de 1,5 µl em cada sítio (i) AP=+1.0, L=-2.1, DV=-2.9; e (ii) AP=+0.3, L=-2.3, DV=-2.9. Foram injetados 6 µg/µl de uma solução de 6-OHDA ou de solução salina contendo 0.02% de ácido ascórbico (HEUER *et al.*, 2012), utilizando uma micro seringa Hamilton 705 (50 µl) acoplada ao aparelho estereotático e a bomba de infusão BI-2008. As injeções foram realizadas a uma taxa de 1µl/min. Controles receberam solução de 0,9% de salina estéril contendo 0,02mg/ml de ácido ascórbico.

Ao final da cirurgia, foi realizada sutura com fio Shalon ® suturas, de nylon 3 cm, cuticular; foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,04 mL) e os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W até recuperação da anestesia. Controles receberam solução de 0.9% de salina estéril contendo 0.02 mg/ ml de ácido ascórbico.

2.5 Cuidados pós cirúrgicos

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais operados receberam, para analgesia, paracetamol diluído em água (1g/L) disponível na gaiola com acesso *ad libitum* por 3 dias, conforme metodologia de cuidados pós-operatórios descrita por Heuer et al. (2012). No quarto dia pós-cirúrgico os animais receberam o tratamento subcutâneo com a apitoxina, melitina ou salina, de acordo com o grupo a que pertenciam. Adicionalmente, os animais submetidos à lesão foram pesados semanalmente com o objetivo de identificar se apresentaram perda de peso em virtude da intervenção cirúrgica.

2.6 Doses e aplicações de apitoxina e melitina

As concentrações de apitoxina e melitina utilizadas foram diluídas, respectivamente, em 40 µl de salina, conforme estudo realizado por Kim et al. (2011a) e em 20 µl de salina, de acordo com Yang et al. (2011) e administradas por via subcutânea. A apitoxina e a melitina foram administradas 1 vez a cada 2 dias, conforme o estudo de Doo et al. (2010), por 3 semanas, a partir do quarto dia após a lesão. Durante todos os procedimentos para a manipulação do veneno foram utilizados os equipamentos de proteção individual (EPI's), a citar: luvas de látex natural sobre luvas de procedimento, óculos de segurança e máscara.

2.7 Testes de comportamento

2.7.1 Teste do Campo Aberto (CA)

Inicialmente descrito por Walsh e Cummins (1975), o teste de campo aberto consiste na mensuração de comportamentos expressados ao se colocar um animal em espaço aberto novo, de onde a fuga do mesmo é evitada pelas paredes que o circundam. Este teste pode ser utilizado para avaliação da atividade motora e do estado emocional dos animais (WHIMBEY; DENENBERG, 1967) e permite prever a intensidade da lesão produzida pela 6-OHDA (FORNAGUERA; SCHWARTIN, 1999; WALSH; CUMMINS, 1975). O equipamento de madeira, recoberto de fórmica na cor branca, consiste num quadrilátero com 4830,25 cm² de área e paredes com 34,5 cm de altura. A base é subdividida em dezesseis quadrantes, conforme Figura 1.



Figura 1. Arena para realização do teste de campo aberto. Fonte: Camila Gomes Dantas.

Os parâmetros avaliados foram: (1) a frequência dos comportamentos de exploração horizontal (número de quadrantes percorridos pelo animal com as quatro patas - *crossings*), (2) exploração vertical (manutenção do animal apenas sobre as patas posteriores - *rearing*), (3) o número de bolos fecais expelidos e (4) comportamentos de autolimpeza (*grooming*) executados. Cada animal foi avaliado individualmente durante 5 minutos e teve seu comportamento registrado em vídeo.

O teste foi realizado 30 dias após a cirurgia, de acordo com Francardo et al. (2011) e Bernstein et al. (2011). Entre o teste de um animal e outro, o equipamento foi limpo com álcool 20% para evitar a influência do odor de outros animais.

2.7.2 Teste de Comportamento Rotatório (CR)

O teste de comportamento rotatório consiste em analisar a intensidade da lesão provocada pela 6-OHDA. Neste teste, o avaliador observa e quantifica o número e o sentido de giros de 360° realizados pelos animais ao redor do eixo do próprio corpo, contralateral ou ipsi lateral à lesão. É necessário observar a decorrência de tempo suficiente para manifestação do CR, uma vez que depende do aumento da sensibilidade sináptica, mecanismo compensatório à lesão (UNGERSTEDT, 1971).

Os animais foram alocados em recipiente cilíndrico (31 cm de diâmetro e parede com 13 cm de altura) e o início do teste ocorreu cinco minutos após a aplicação do agonista

dopaminérgico de curta duração de ação, neste caso Hidrocloreto de Apomorfina (0,5 mg/kg; dissolvido em 0,3 mL de solução salina 0.9%; via s.c.) de acordo com Kim et al. (2011a) e Lancu et al. (2005) e ocorreu durante 60 minutos. Os animais foram testados 30 dias após a cirurgia, conforme Bernstein et al. (2011), e tiveram seus comportamentos registrados em vídeos.



Figura 2. Visualização do teste de comportamento rotatório. Fonte: Camila Gomes Dantas.

2.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Duncan, ($P < 0,05$), sendo considerado variável o fator tratamento. Para tanto, foi utilizado o programa SSPS versão 19.0.

3. RESULTADOS

No teste campo aberto, no que se refere ao parâmetro motor de exploração horizontal, observou-se que os grupos 6-OHDA/ salina e 6-OHDA/ apitoxina (0,6 mg/Kg) apresentaram redução significativa ($F_{8-48}=3,005$; $p=0,010$; ANOVA) em relação aos grupos salina/ apitoxina (0,1 mg/Kg), salina/ apitoxina (1,2 mg/Kg), 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/Kg), 6-OHDA/ apitoxina (1,2 mg/Kg) e em relação ao grupo 6-OHDA/ melitina. Estes dados podem ser observados na Figura 3. No que se refere ao comportamento de explorações

verticais, observou-se que apenas os grupos 6-OHDA/ salina e 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/Kg) apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo controle (salina/ salina; $F_{8-48}=1,486$; $p=0,05$; Figura 4).

No parâmetro bolo fecal, observou-se que o grupo salina/ apitoxina (0,6 mg/ Kg), apresentou aumento significativo ($4,0\pm0,5$) em relação a todos os outros grupos avaliados: salina/ salina ($1,4\pm0,6$), salina/ apitoxina (0,1 mg/Kg) ($0,4\pm0,4$), salina/ apitoxina 1,2 mg/Kg ($0,5\pm0,5$), 6-OHDA/ salina ($1,1\pm0,4$), 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/kg) ($0,7\pm0,7$), 6-OHDA/ apitoxina (0,6 mg/kg) ($0,3\pm0,2$), 6-OHDA/ apitoxina (1,2 mg/kg) ($0,0\pm0,0$), onde $F_{8-48}=4,145$; $p=0,001$. No que se refere a autolimpeza (*grooming*), o grupo 6-OHDA/ apitoxina (1,2 mg/Kg) apresentou aumento com tendência significativa ($2,0\pm0,45$) em relação aos grupos salina/ apitoxina (0,1 mg/Kg) ($1,0\pm0,0$), salina/ apitoxina (1,2 mg/Kg) ($1,0\pm0,0$), 6-OHDA/ salina ($1,10\pm0,18$), 6-OHDA/ apitoxina (0,1 mg/Kg) ($1,0\pm0,0$) e 6-OHDA/ apitoxina (0,6 mg/Kg) ($1,0\pm0,0$) ($F_{8-48}=1,933$; $p=0,06$).

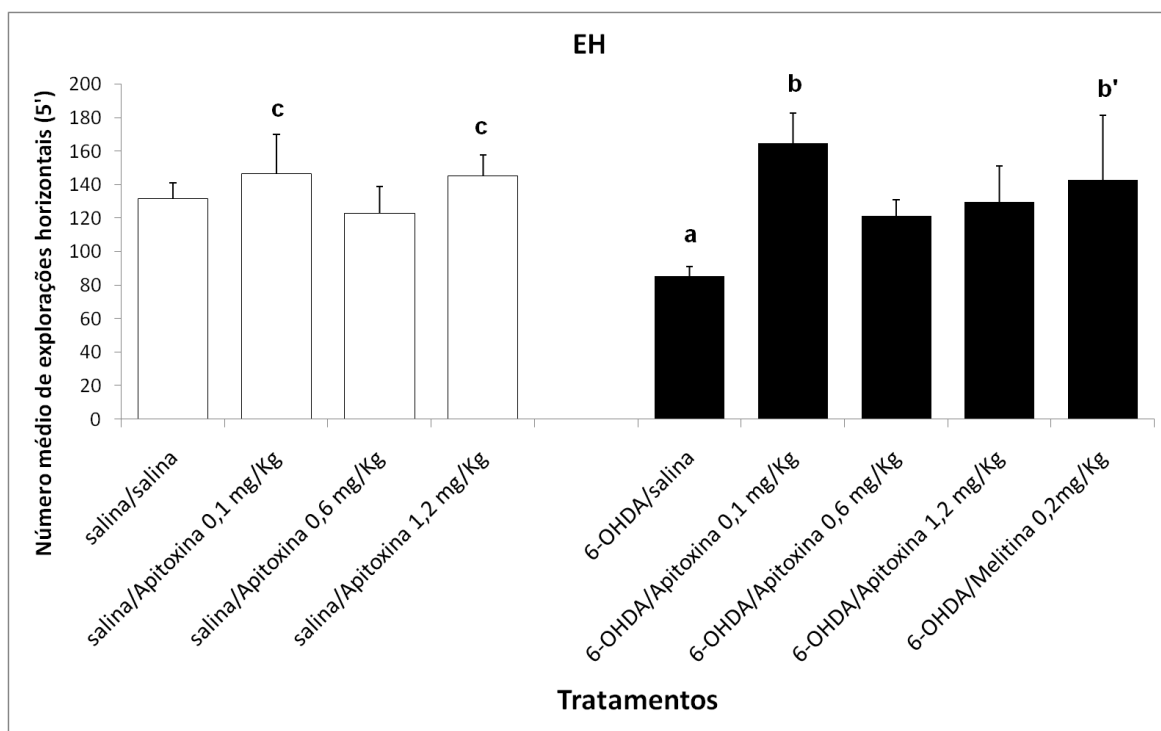


Figura 3: Resultados do parâmetro de exploração horizontal (EH) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações horizontais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas: “a” diferente de “b” e “c” ($p<0,05$); “b” diferente de “a” ($p<0,001$); “b’ ” diferente de “a” ($p<0,05$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Duncan.

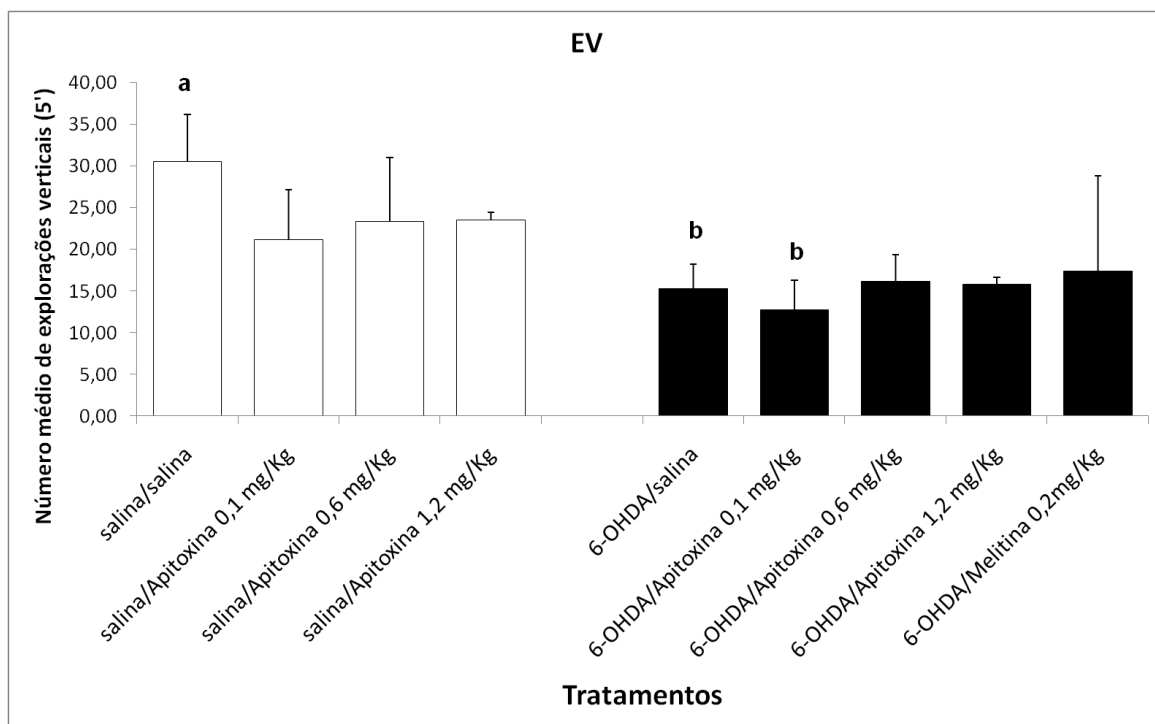


Figura 4: Resultados do parâmetro de exploração vertical (EV) no teste de campo aberto. As colunas representam as médias de explorações verticais nos grupos e as barras representam o erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas: “b” diferente de “a” ($p < 0,05$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Duncan.

No teste de comportamento rotatório, animais que receberam 6-OHDA intracerebral e salina via subcutânea, realizaram média de 70 rotações contralaterais à lesão, enquanto o grupo que recebeu a 6-OHDA e foi tratado com apitoxina na concentração (0,1 mg/ Kg), teve o número de giros reduzido a zero. Adicionalmente, a apitoxina nas doses de 0,6 mg/kg e 1,2 mg/Kg, apresentaram média de 16,5 e 190,5 rotações para a esquerda, respectivamente. Animais que receberam 6-OHDA intracerebral e melitina via subcutânea, apresentaram média de 348 rotações para este mesmo lado (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados do teste de comportamento rotatório

Grupos experimentais	Rotações (-)
6-OHDA/ SALINA	70 ($\pm 9,42$)
6-OHDA/ APITOXINA 0,1mg/Kg	0 (± 0)
6-OHDA/ APITOXINA 0,6mg/Kg	16,5 ($\pm 3,7$)
6-OHDA/ APITOXINA 1,2mg/Kg	190,5 ($\pm 117,9$)
6-OHDA/ MELITINA 0,2mg/Kg	348 (± 160)

Médias de rotações contralaterais $\pm$ erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

O modelo de lesão pela aplicação de 6-OHDA em ratos é utilizado desde 1968, a partir de sua descrição por Ungersted, de forma que os efeitos comportamentais da administração da toxina são bem conhecidos. Estudos mais recentes foram realizados em camundongos com o intuito de caracterizar o decurso temporal da morte neuronal e das alterações motoras (HEUER *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que a aplicação de 6-OHDA no estriado de camundongos induziu a manifestação de giros no teste de comportamento rotatório e a diminuição de parâmetros motores do teste de campo aberto, eventos estes relacionados à morte neuronal dopaminérgica.

Quando a lesão foi acompanhada pelo tratamento com a apitoxina na dose de 0,1 mg/Kg, estes efeitos foram reduzidos. Por outro lado, o tratamento com a melitina, embora tenha elevado o número de explorações horizontais, aumentou significativamente o comportamento rotatório, demonstrando provável neurotoxicidade.

No que concerne as concentrações e vias de administração da substância, o presente estudo apresentou resultados que permitem inferir possível neuroproteção da apitoxina na concentração de 0,1 mg/Kg, via subcutânea, corroborando com Yang *et al.* (2010). Entretanto, estes autores fizeram uso do ponto de acupuntura ST36, anatomicamente localizado 5mm abaixo e lateral a tuberosidade anterior da tíbia. Em conformidade, Kim *et al.* (2011a) também utilizaram injeção subcutânea no referido acuponto em virtude dos efeitos anti-inflamatórios do ST36 relatados em estudos anteriores, o que pode explicar o efeito neuroprotetor do veneno de abelhas na concentração de 1,2 mg/Kg encontrado por estes autores. Adicionalmente, foi a dose de 1 mg/Kg, via intraperitoneal, que apresentou este efeito na pesquisa de Chung *et al.* (2012).

Neste sentido, é cabível salientar os estudos realizados por Jeon *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2005), a partir de publicações anteriores que relataram que a acupuntura isolada demonstrou ter efeitos neuroprotetores e diminuiu os déficits comportamentais em modelos animais da DP. Kim *et al.* (2005), identificaram que a acupuntura isolada no acuponto ST36 duas semanas após a injeção unilateral de 6-OHDA no estriado de ratos, reduziu significativamente as rotações induzidas por apomorfina e protegeu contra a perda neuronal dopaminérgica.

Em concordância, Jeon *et al.* (2008) investigaram os efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura nos acupontos ST36, GB34, SI3 e BL62 em ratos com DP induzidas por MPTP e identificaram que ambos procedimentos terapêuticos aplicados isoladamente protegeram contra degeneração neuronal DA quando aplicados no GB34. Estes dados corroboram com estudos atuais onde a acupuntura no GB34 de animais que receberam

MPTP, melhorou função locomotora, em virtude da redução da apoptose neuronal no estriado (LU *et al.*, 2012), e aumentou liberação de dopamina na fenda sináptica, sugerindo aumento da neurotransmissão dopaminérgica, normalização da atividade dos gânglios basais e consequente melhora da função motora (KIM *et al.*, 2011b).

Assim, camundongos tratados no estudo de Doo *et al.* (2010) receberam 0,02 mL (1:2000 w/v) de apitoxina no acuponto GB34, localizado na intersecção das linhas da borda anterior da cabeça da fíbula (YIN *et al.*, 2008), antes da injeção quinzenal de MPTP, ocasionando efeito protetor nas células TH+ na SN compacta. Adicionalmente, Yoon *et al.* (2013) utilizaram a mesma metodologia e ratificaram, via análise imunohistoquímica e por espectroscopia de ressonância magnética, o efeito neuroprotetor da apitoxina no acuponto GB34 em modelo animal da DP induzido por MPTP, onde identificaram alterações substanciais nos perfis neuroquímicos estudados, em especial nas proporções do complexo glutamato/ creatina, com redução significativa dos valores de base no grupo tratado com apitoxina.

A estimulação do GB34 por Park *et al.* (2003) também reduziu significativamente o déficit motor rotacional e gerou aumento da sobrevivência de DA na SN de ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA. De modo que, segundo os autores, somente a acupuntura, sem o uso de qualquer droga, apresenta efeitos neuroprotetores em modelo animal de DP induzido por esta neurotoxina.

No presente estudo, não foram utilizados acupontos para administração da apitoxina. Esta substância foi injetada via subcutânea na região cervical dorsal do animal, adotada por ser amplamente vascularizada, facilitando assim a absorção da substância. Os achados de Lu *et al.* (2012), Kim *et al.* (2011b), Jeon *et al.* (2008), Kim *et al.* (2005) e Park *et al.* (2003), permitem inferir que a preferência por pontos de acupuntura já conhecidos por mediar efeitos anti-inflamatórios, não permite o estudo do efeito isolado do veneno de abelhas, de maneira que os resultados altamente significativos apresentados a partir da utilização desta via de administração para a apitoxina, podem ser resultantes dos efeitos acumulativos decorrentes da associação de mecanismos terapêuticos.

No que se refere às alterações comportamentais, que refletem a efetividade e extensão da lesão, é possível observar no teste de campo aberto que camundongos lesionados pela 6-OHDA, e que receberam salina via subcutânea, apresentaram diminuição no parâmetro de exploração horizontal. Adicionalmente, nota-se redução também do parâmetro de exploração vertical deste grupo em relação ao controle. Estes dados foram coerentes com os estudos realizados por Heuer *et al.* (2012) e Francardo *et al.* (2011), que utilizaram este modelo de lesão estriatal em camundongos e obtiveram redução da atividade motora, indicando assim a efetividade da lesão produzida neste estudo.

Entretanto, este efeito foi revertido quando a lesão foi acompanhada do tratamento com a apitoxina na concentração de 0,1 mg/Kg, indicando melhora nos padrões motores avaliados. Estudo anterior, realizado por Yang et al. (2010) apontou que a dose de 0,1µg/g de apitoxina aumentou a atividade motora e reduziu a neuroinflamação em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica. Deste modo, embora os aspectos clínicos, neuropatológicos e debilitantes destas doenças sejam distintos, elas compartilham um padrão de neurodegeneração em regiões anatomicamente ou funcionalmente relacionadas, onde pesquisas realizadas por Chung et al. (2012), Yang et al. (2011), Kim et al. (2011a) e Yang et al. (2010) apontam possível efeito neuroprotetor da apitoxina sobre estas enfermidades.

Adicionalmente, no teste de comportamento rotatório, animais lesionados e tratados com apitoxina (0,1 mg/Kg) realizaram número médio de giros contralaterais a lesão inferior ao observado no grupo lesionado sem tratamento, indicando que a intensidade da lesão foi menor quando os animais receberam esta concentração do veneno de abelhas associada à lesão. Este dado é coerente com o obtido no parâmetro de exploração horizontal no teste de campo aberto, onde a mesma dose da apitoxina (0,1 mg/Kg) indicou melhora da atividade motora com sugestão de neuroproteção. A dose de 1,2 mg/Kg desta substância, acentuou o número de rotações neste teste, sugerindo possível efeito prejudicial a lesão, resultado contrário ao estudo realizado por Kim et al. (2011a) que identificaram possível efeito neuroprotetor da apitoxina sobre a DP na concentração de 1,2 mg/Kg. Vale ressaltar que, na maior concentração, podem haver maiores quantidades de melitina.

No que concerne aos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com melitina, observou-se que houve aumento no número de giros à esquerda, indicando que a melitina isolada neste estudo não exerceu efeito protetor. Em contrapartida, Yang et al. (2011) ao utilizarem 0,2 µg/g de melitina em modelo animal de ELA, identificaram melhora da função motora e redução no nível de morte neuronal na coluna espinhal, quando comparados ao grupo controle, sugerindo potencial inibição da neuroinflamação nesta doença.

De maneira geral, os resultados do presente trabalho são coesos com estudos que utilizaram a apitoxina para o tratamento de camundongos com DP, entretanto, o modelo experimental utilizado na literatura, foi o induzido por MPTP (CHUNG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011a). Neste contexto, por se tratar de um modelo de lesão agudo, Kim et al. (2011a) e Chung et al. (2012), sugeriram possível efeito neuroprotetor da apitoxina por meio da imunohistoquímica, onde evidenciaram redução da ativação da resposta microglial e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, respectivamente.

Finalmente, pesquisas recentes realizadas por Heuer et al. (2012), Smith et al. (2012), Francardo et al. (2011), Cenci e Lundblad (2007) e Lundblad et al. (2004) têm relatado que a implementação de cuidados pós-operatórios intensivos pode reduzir a mortalidade de animais para níveis eticamente aceitáveis. Observa-se na literatura, que

estudos que adotaram modelo de lesão com 6-OHDA apresentaram altas taxas de mortalidade, como ocorreu em Grealish et al. (2010), onde houve cerca de 82% de perdas.

Deste modo, Francardo et al. (2011), estabeleceram procedimentos para prevenir questões como desidratação e perda de peso, o que resultou em taxa de sobrevivência de 80 a 100% de camundongos com extensa depleção dopaminérgica. No presente estudo, houve morte de um animal do grupo 6-OHDA/ Apitoxina 0,1mg/Kg e um do grupo salina/ Apitoxina 1,2 mg/Kg, de maneira que 95,6% dos roedores lesionados se recuperaram da cirurgia, provavelmente devido a instalação de cuidados pós-operatórios, corroborando com os dados de Heuer et al. (2012), que estabeleceu cuidados como analgesia e controle de peso.

5. CONCLUSÕES

Os achados comportamentais do presente estudo permitem concluir que a apitoxina na concentração de 0,1 mg/Kg induz melhora na recuperação motora e sugerem um possível efeito neuroprotetor sobre a morte neuronal induzida por 6-OHDA. Entretanto, faz-se necessária análise imunohistoquímica dos grupos avaliados a fim de analisar e comparar a efetividade do tratamento com apitoxina e melitina sobre a lesão com os trabalhos realizados com MPTP já disponíveis na literatura.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, R. M. M.; MORAES, R. L. M. S.; MATHIAS, M. I. C. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, *Apidae*). **Micron**, v. 41, n. 2, p. 172-175, 2010.
- BERNSTEIN, A. I.; GARRISON, S. P.; ZAMBETTI, G. P.; O'MALLEY, K. L. 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA-dependent cell death. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. 2, p.1-13, 2011.
- BOGAART, G. V. D.; GUZMA' N, J. V.; MIKA, J. T.; POOLMAN, B. On the Mechanism of Pore Formation by Melittin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 33854-33857, 2008.
- CASTRO, H. J.; MENDEZ-LNOCENCIO, J. I.; OMIDVAR, B.; OMIDVAR, J.; SANTILLI, J.; NIELSEN, H. S. JR.; PAVOT, A. P., RICHERT, J. R., BELLANTI, J. A. A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. **Allergy Asthma Proceedings**, v. 26, n. 6, p. 470-476, 2005.
- CENCI, M. A.; LEE, C. S.; BJORKLUND, A. L-Dopa-Induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. **The European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 2694-2706, 1998.
- CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Ratings of I-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 25, p. 1-23, 2007.
- CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151-183, 2010.
- CHO, S-Y.; SHIM, S-R.; RHEE, H. Y.; PARK, H-J.; JUNG, W-S.; MOON, S-K.; PARK, J-M.; KO, C-N.; CHO, K-H.; PARK, S-U. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18, n. 8, p. 948-952, 2012.
- CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.
- DAMACENA, J.F.V.; HELMER, L.A.; SANTOS, M.R. dos. **Projeto técnico empreendedor: Empresa Júnior apícola**. Escola Agrotécnica Federal de Colatina, Espírito Santo, 2005. 22f.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease In Rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303-317, 2002.

DOO, A-R.; KIM, S.T.; KIM, S-N.; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K.; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010. Supplement 1.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A₂ levels. **Toxicon**, v.56, n. 3, p. 355-362, 2010.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. (Salvador). PAIVA, F. P. de.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. (Org). 2005. p-1-28.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera Stings. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 4, p. 194-204, 2006.

FORNAGUERA, J.; SCHWARTING, R. K. Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 23, n. 8, p.1353-1368, 1999.

FRANCARDO, V.; RECCHIA, A.; POPOVIC, N.; ANDERSSON, D.; NISSBRANDT, H.; CENCI, M. A. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 327-40, 2011.

FRANCO, R.; LI, S.; RODRIGUEZ-ROCHA, H.; BURNS, M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 289-300, 2010.

GALTER, D. Parkinson's disease: recent progress. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 7, p. 1369, 2008.

GREALISH, S.; MATTSSON, B.; DRAXLER, P.; BJORKLUND, A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 12, p. 2266-2278, 2010.

HAN, S.; LEE, K.; YEO J.; KIM, W.; PARK, K. Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 3, p. 67-72, 2011.

HEISTERS, D. Parkinson's: symptoms, treatments and research. **British Journal of Nursing**, v. 20, n. 9, p. 548-554, 2011.

HERNÁNDEZ, R. V. Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. **Iatreia**, v. 16, n. 3, p. 217-227, 2003.

HEUER, A.; SMITH, G. A.; LELOS, M. J.; LANE, E. L.; DUNETT, S. B. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 30-43, 2012.

HIDER, R. C. HONEYBEE VENOM: A rich source of pharmacologically active peptides. **Endeavour**, v. 12, n. 2, p. 60-65, 1988.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. Drug-induced behavioral tests. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 2005.

JEON, S.; KIM, Y. J.; KIM, S-T.; MOON, W.; CHAE, Y.; KANG, M.; CHUNG, M-Y.; LEE, H.; HONG, M-S.; CHUNG, J-H.; JOH, T. H.; LEE, H.; PARK, H-J. Proteomic analysis of the neuroprotective mechanisms of acupuncture treatment in a Parkinson's disease mouse model. **Proteomics**, v. 8, n. 22, p. 4822-4832, 2008.

KIM, Y-K.; LIM, H-H.; SONG, Y-K.; LEE, H-H.; LIM, S.; HAN, S-M.; KIM, C-J. Effect of acupuncture on 6-hydroxydopamine-induced nigrostratal dopaminergic neuronal cell death in rats. **Neuroscience Letters**, v. 384, n. 1-2, p. 133-138, 2005.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209-217, 2011a.

KIM, S. N.; DOO, A. R.; PARK, J. Y.; BAE, H.; CHAE, Y.; SHIM, I.; LEE, H.; MOON, W.; LEE, H.; PARK, H. J. Acupuncture enhances the synaptic dopamine availability to improve motor function in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27566, 2011b.

KOKOT, Z. J.; MATYSIAK, J.; URBANIAK, B.; DEREZIŃSKI, P. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 7, p. 2487-2494.

KOLLER, W. C. Treatment of early Parkinson's disease. **American Academy of Neurology**, v. 58, n. 1, p. 79-86, 2002.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: How close are we to the clinic? **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 303-312, 2008.

LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-35, 2006.

LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 368196 p. 1-9, 2012.

LEE, W.R.; KIM, S.J.; PARK, J.H.; KIM, K. H.; CHANG, Y. C.; PARK, Y. Y.; LEE, K. G.; HAN, S. M.; YEO, J. H.; PAK, S. C.; PARK, K. K. Bee venom reduces atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory mechanism. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1077-1092, 2010.

LEW, M. Overview of Parkinson's disease. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 12, p. 155-160, 2007.

LU, Z. Y.; ZHAO, H.; WANG, T.; CHEN, J.; ZONG, L. Effects of acupuncture on behavior and striatal apoptosis in mice with Parkinson disease. **Zhen Ci Yan Jiu - Acupuncture Research**, v. 37, n. 3, p. 186-190, 2012.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; LINDGREN, H.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 110-123, 2004.

MARSDEN, C. D. Problems with long-term levodopa therapy for Parkinson's disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 17, n. 2, p. 32-44, 1994.

MATYSIAK, J.; SCHMELZER, C. E. H.; NEUBERT, R. H. H.; KOKOT, Z. J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 273-278, 2011.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, A. Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 1, p. 55-65, 2009.

MOON, D. O.; PARK, S. Y.; LEE, K. J.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; KIM, M. O.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 8, p. 1092-1101, 2007.

MUANGPAISAN, W.; MATHEWS, A.; HORI, H.; SEIDEL, D. A Systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 94, n. 6, p. 749-755, 2011.

NAM, K. W.; JE, K. H.; LEE, J. H.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; KANG, S. K.; MAR, W. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1beta) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. **Archives Pharmacology Research**, v. 26, n. 5, p. 383-388, 2003.

NAMAKA, M.; CROOK, A.; DOUPE, A.; KLER, K.; VASCONCELOS, M.; KLOWAK, M.; GONG, Y.; WOJEWNIK-SMITH, A.; MELANSON, M. Examining the evidence: Complementary adjunctive therapies for multiple sclerosis. **Neurological Research**, v. 30, n. 7, p. 710-719, 2008.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 173-194, 2011.

PACÁKOVÁ, V.; STULÍK, K. Validation of a method for determination of phospholipase A2 and melittin in bee venom preparations by capillary electrophoresis. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 549-554, 2000.

PARK, H. J.; LIM, S.; JOO, W. S.; YIN, C. S.; LEE, H. S.; LEE, H. J.; SEO, J. C.; LEEM, K.; SON, Y. S.; KIM, Y. J.; KIM, C. J.; KIM, Y. S.; CHUNG, J. H. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. **Experimental Neurology**, v. 180, n. 1, p. 93-98, 2003.

PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, S. J.; LEE, W. R.; LEE, K. G.; PARK, K. K. Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- α and actinomycin D. **Archives Pharmacal Research**, v. 33, n. 2, p. 215-223, 2010.

RAO, S. S.; HOFMANN, L. A.; SHAKIL, A. Parkinson's disease: diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 74, n. 12, p. 2046-2054, 2006.

RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747-769, 2011.

RIZELIO, V.; SZAWKA, R. E.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; RIGON, P.; SAUR, L.; MATHEUSSI, F.; DELATTRE, A. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MENESES, M.; FERRAZ, A. C. Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 1, p. 85-95, 2010.

SCHAPIRA, A. H. V.; EMREB, M.; JENNER, P.; POEWE, W. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 16, n. 9, p. 982-989, 2009.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA-JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptídes**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

SMITH, G. A.; HEUER, A.; DUNNETT, S. B.; LANE, E. L. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting L-DOPA-induced dyskinesia. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 281-292, 2012.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H.; S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246-270, 2007.

SUN, G. Y.; XU, J.; JENSEN, M. D.; SIMONYI, A. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 205-213, 2004.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 367, p. 69-93, 1971.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. Mechanisms mediating the production of environmentally induced brain changes. **Psychological Bulletin**, v. 82, n. 6, p. 986-1000, 1975.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-504, 1967.

WICHMANN, T.; DOSTROVSKY, J. O. Pathological basal ganglia activity in movement disorders. **Neuroscience**, v. 198, p. 232-244, 2011.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.-O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, p. S1-S58, 2011. Suplemento 1.

YANG, E. J.; JIANG, J. H.; LEE, S. M.; YANG, S. C.; HWANG, H. S.; LEE, M. S.; CHOI, S. M. Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 69, 2010.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011.

YIN, C. S.; JEONG, H-S.; PARK, H-J.; BAIK, Y.; YOON, M-H.; CHOI, C-B.; KOH, H. G. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 159-165, 2008.

YOKOYAMA, H.; KUROIWA, H.; KASAHARA, J.; ARAKI, T. Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. **Acta Neurobiologia e Experimentalis**, v. 71, n. 2, p. 269-280, 2011.

YOON, M-H.; LEE, D-W.; KIM, H-J.; CHUNG, J-Y.; DOO, A-R.; PARK, H-J.; KIM, S-N.; CHOE, B-Y. Investigation of the neuroprotective effects of bee-venom acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease by using immunohistochemistry and In-vivo¹H magnetic resonance spectroscopy at 9.4 T. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 62, n. 2, p. 320-327, 2013.

ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 171-178, 2010.

ZURIER, R. B.; MITNICK, H.; BLOOMGARDEN, D.; WEISSMANN, G. Effect of bee venom on experimental arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 32, n. 5, p. 466-470, 1973.

CONCLUSÃO GERAL

Os achados do presente estudo permitem concluir que a apitoxina apresenta importantes efeitos farmacológicos nas doses estudadas. A dose de 1,2 mg/Kg diminuiu as estereotipias, induziu catalepsia e modificou parâmetros comportamentais em roedores, indicando provável ação antipsicótica, possivelmente pela interação com receptores dopaminérgicos. A administração de 0,1 mg/Kg de apitoxina diminuiu os déficits motores e o comportamento rotatório induzidos pela aplicação de 6-OHDA, sugerindo possível efeito neuroprotetor sobre a morte neuronal dopaminérgica. Por outro lado, os resultados obtidos após tratamento com a melitina mostraram-se controversos. Dessa forma, mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos de ação sobre as regiões cerebrais envolvidas.

Os resultados possibilitam maior conhecimento acerca deste produto e sobretudo, estima-se que a extração da apitoxina para fins terapêuticos fortalecerá a atividade apícola, valorizando o desenvolvimento regional e favorecendo a fixação do homem no campo, injetando na economia uma nova vertente para os apicultores por meio da exploração de mais um produto, gerando emprego, renda e melhor qualidade de vida.

ANEXOS

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação do efeito neuroprotetor da apitoxina em modelo animal da doença de Parkinson

Pesquisador Responsável Margarete Zanargo Gomes

Data da Versão 10/05/2011

Cadastro 050511

Data do Parecer 14/07/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Geral: Avaliar o efeito do tratamento com veneno de abelha e seus principais componentes, melitina e fosfolipase A2, na progressão da morte neuronal após aplicação de 6-OHDA. **Específicos:** Identificar e caracterizar a composição do veneno de abelhas africanizadas proveniente da região de Sergipe, ao longo do ano; observar os efeitos do veneno puro (sinergia de ação dos diversos componentes) em modelo animal da doença de Parkinson; avaliar e comparar os efeitos da melitina e da fosfolipase A2 isoladas no mesmo modelo animal 6-OHDA com os dados obtidos para o veneno. A averiguação do possível efeito neuroprotetor será realizada por meio de testes de comportamento e avaliação do tecido cerebral (TH), enquanto as modificações em sistemas neurotransmissores será verificada por meio da expressão da enzima NOS, neuronal e induzida.

Sumário do Projeto

A Doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa progressiva caracterizada pela redução da dopamina cerebral e apresenta-se em prevalência como segunda desordem neurodegenerativa relacionada à idade. A sintomatologia clássica da doença consiste em: tremor, rigidez muscular, bradicinesia, instabilidade postural e, em alguns casos, disfunção cognitiva e evolução para quadros demenciais, resultando em perturbações do tônus e movimentos involuntários. Mesmo com os grandes avanços, a fisiopatogenia da doença de Parkinson ainda não é exatamente conhecida e os tratamentos disponíveis são apenas sintomáticos. Estudos recentes têm apontado potencial efeito neuroprotetor e antiinflamatório do veneno da abelha em doenças neurológicas e reumáticas. A apitoxina é o veneno produzido pela abelha *Apis mellifera* e constitui uma mistura complexa de enzimas, peptídeos e aminoácidos e sua composição pode variar em função de mudanças climáticas e de temperatura. Algumas proteínas, em especial a melitina, equivalente a 50% de seu peso seco, têm ação antiinflamatória mais potente que a cortisona e seus derivados, sobre os quais têm a vantagem adicional de apresentar menor ocorrência de efeitos colaterais. Já a fosfolipase A2 representa 12% do peso seco do veneno. Assim, a administração da apitoxina pode representar uma nova alternativa de tratamento para a doença de Parkinson. Neste trabalho nos propomos a analisar as propriedades bioativas da apitoxina e seus principais componentes, melitina e fosfolipase A2, e testar os efeitos do tratamento na progressão da morte neuronal em modelo experimental da doença de Parkinson. Os resultados serão caracterizados a partir da análise do comportamento e de alterações estruturais e funcionais nos encéfalos de roedores (modificações na expressão das enzimas tirosina-hidroxilase e sintase do óxido nítrico), após a lesão pela aplicação intracerebral da neurotoxina 6-hidroxidopamina. O trabalho será desenvolvido no Instituto de Tecnologia e Pesquisa na Universidade Tiradentes, junto ao Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, mediante aprovação deste Conselho.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Universidade Tiradentes - UNIT

Prof.^a Adriana Karla de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

Página 1-2

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 54 Local 54
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crêrios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto de grande relevância para comunidade científica e comunidade de maneira geral, sendo considerado aprovado no que refere a seus aspectos éticos.

Universidade Tiradentes - UNIT
Prof.^a Adriana Karla de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

De: Toxicon <toxcon@elsevier.com>

Quarta-feira, 13 de Março de 2013 11:29

Para: quetezanardo@yahoo.com.br

Assunto: Submission Confirmation

Dear Ph.D Margarete Zanardo Gomes,

Your submission entitled "Effects of apitoxin on central nervous system of mice" has been received by Toxicon

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxcon/>.

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/TOXCON/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Toxicon