

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO VENENO DE
Apis mellifera **SOBRE O**
SARCOMA TG180

EDMILSA SOCORRO DE ARAÚJO

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Uberlândia - MG
Dezembro - 1995**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO VENENO DE *Apis mellifera* SOBRE O
SARCOMA TG180.

EDMILSA SOCORRO DE ARAÚJO

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas sob a
orientação do Prof. Dr. MALCON A.
MANFREDI BRANDEBURGO.

Uberlândia - MG
Dezembro - 1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO VENENO DE *Apis mellifera* SOBRE
O SARCOMA TG180.**

EDMILSA SOCORRO DE ARAÚJO

Aprovada pela Comissão em 19/1/85 Conceito 3 = 90,0

PROF. Dr. MALCON A. MANFREDI BRANDEBURGO
Orientador

PROF^ª Dra. ANA MARIA BONETTI
Co-Orientadora

PROF. Ms. JÚLIO CESAR NEPOMUCENO
Conselheiro

PROF^ª Ms. NORA-NEY SANTOS BARCELOS
Coordenadora do Curso

Uberlândia, 19 de Jan 1995

Universidade Federal DE Uberlândia
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS. .
CURSO DE CIÊNCIAS Biológica

EFEITO DO VENENO DE *Apis mellifera* SOBRE O SARCOMA TG180

Edmilsa Socorro de Araújo

MONOGRAFIA APRESENTADA A.
COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLOGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL.
DE UBERLANDIA, PARA A OBTENÇÃO DE GRAU
EM BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLOGICAS

UBERLANDIA MG
DEZEMBRO\1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO VENENO DE *Apis mellifera* SOBRE O SARCOMA
TG180

Edimilsa Socorro de Araújo
Orientador: Malcon Antonio Manfrede Brandeburgo
Conselheiros
Ana Maria Bonetti
Julio Cesar Nepomuceno

Monografia apresentada a
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do
Grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Uberlândia-MG
Dezembro -1995

Dedico esta monografia à todos os pesquisadores de Ciências Biológicas. Principalmente ao meus mestres,

Prof. Dr. Malcon Antonio Manfredi Brandeburgo

Profª Dra. Ana Maria Bonetti

Aos meus familiares:

Francisca Maria de Araujo, minha mãe

Ives Aparecida;

Ranier Antonio de Araújo

Arnaldo de Araújo .

Plinio Araujo, meus irmãos

Agradecimento.

Agradeço primeiramente a Deus Criador de todas as leis que regem o universo , criador do pensamento que é o bem maior da criatura.

Em segundo lugar agradeço aos meus professores pela dedicação para comigo durante minha jornada universitária

Prof. Dr Malcon Antonio M. Brandeburgo,
Pela dedicação e colaboração nesta monografia

Profa Dra Ana Maria Bonetti,
Pelo apoio e dedicação para comigo no decorrer do curso e principalmente desta monografia.

Prof. Ms. Julio Cesar Neponoceno,
Pela dedicação nesta monografia

Prafa. Dra. Cláudia Valéria Dansa,
Pela dedicação e incentivo no decorrer do curso.

Prof Dr. Alexandre Ruzczyk,
Pela colaboração e apoio no decorrer do curso .

Prof Jimi Naoki Nakajima,
Pelo apoio e credibilidade para comigo, durante o curso

Profa Ana Maria Coelho Carvalho,
Pela colaboração e credibilidade para comigo no decorrer do curso.

Resumo

Efeito do veneno de *Apis mellifera* sobre o tumor Tg180. Camundongos que não receberam qualquer de tratamento, quando inoculados com tumor (via intra peritonial), sobrevivem em média 10 dias, com grande dilatação abdominal. Neste intervalo de tempo o tumor tem morfologia líquida e alto grau de proliferação de célula multinucleada. Camundongos tratados com 3 doses de veneno, 24h após o implante e mantendo-se este período de intervalo entre uma e outra dose, sobrevivem tempo inferior aos não tratados. Os camundongos tratados com três doses de veneno, na quantidade de 0,0005g cada, sobrevivem em média 16 dias. O tumor extraído desses camundongos, tem menor consistência, coloração mais clara e apresenta um menor número de células e não é hemorrágico. O tumor proveniente de camundongos previamente tratados, quando inoculado em camundongos sem tratamento, apresenta um desenvolvimento muito lento. Fêmeas inoculadas são capazes de procriar filhotes saudáveis e quando amamentados pela mãe não apresentam anomalia. Quatro doses desse tratamento não é suportável por camundongos com 26g de peso e 22 dias de vida, enquanto que uma ou duas doses não alteram o tempo de vida dos camundongos tratados em relação aos não tratados.

INDICE

RESUMO	iv
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	35
7. ANEXOS	42

1 . INTRODUÇÃO

Apitoxina é um veneno de natureza protéica, extraído da glândula de veneno localizada no abdômen de abelhas *Apis mellifera*. No último segmento do abdome dessas abelhas está situado o ferrão, estrutura de defesa do inseto, por meio do qual o veneno é inoculado com a finalidade de afugentar inimigos predadores de larvas ou do mel e garantir a harmonia e a produção da colônia.

Os agentes que mais perturbam as colônias melíferas são os insetos das ordens Lepidóptera, Himenóptera e a família Vespidae. Também os mamíferos, como os ursos e principalmente o homem, que é o maior explorador dos produtos obtidos nas colônias melíferas como o mel, as larvas, a geléia real e a própolis.

Lançando mão de vestes apropriadas e técnicas de manejo é possível extrair com segurança, os produtos da colméia. Porém, não é só nas proximidades da colônia que ocorrem os ataques de abelhas pertencentes às castas das

Operárias, os acidentes ocorrem sempre que o inseto é perturbado e a ferroadada ocorre quando a abelha atinge o agressor. Os ataques podem ocorrer em praças, jardins e recintos domiciliares. A picada de uma única abelha é capaz de matar um inseto ou pequenos roedores, em função do peso corporal e quantidade de toxinas presente no veneno.

Quanto aos seres humanos, a literatura não traz nenhum relato de testes com picadas de abelhas, porém relata acidentes com pessoas que já suportaram número superior a vinte ferroadadas. Entretanto, ferroadadas freqüentes podem levar a um quadro de hipersensibilidade e evoluir para uma reação alérgica.

Após atingir um quadro de alergia, uma única picada será letal porque alguns componentes do veneno são capazes de provocar liberações dos grânulos dos mastócitos, os quais são compostos que catalisam reações anafiláticas.

1.1. As glândulas de veneno

Na fase adulta das operárias, as glândulas secretam veneno, o que ocorre entre duas a três semanas de idade (KAISER and MICHL, 1954). Após este período as glândulas começam a degenerar-se (OWEN and BRAIDWOOD, 1974).

Na alteração de funcionamento da glândula é provável que a configuração química do veneno também seja alterada. Outro fator determinante da produção do veneno são as estações do ano, tendo sido comprovado que a produção é

maior nos dias de verão (OVEN and BRAIDWOOD, 1979).

1.2. Natureza do veneno

A composição é protéica, sendo que 88% de seu peso natural é água. Do veneno cristalino, 50% são melitina e os outros 50% são, fosfolipase, hialuronidase, apamina, MCD-péptideos.

As proteínas, hialuronidase e fosfolipase são responsáveis pela resposta imune (KING et al, 1976). É possível que estas proteínas sejam responsáveis pela hipersensibilidade em indivíduos com predisposição, os quais após repetidas ferroadas podem apresentar o quadro alérgico, com manchas vermelhas na pele, inchaço, náuseas e vômito.

Para uma pequena quantidade de pessoas, uma única picada pode ser fatal, devido ao choque anafilático (RICHES, 1982).

1.3. Propriedades da Hialuronidase

A hialuronidase é uma enzima responsável pela hidrólise do ácido hialurônico. É um polímero viscoso e um dos principais responsáveis pela união das células nos tecidos. Quando são destruídas pela hialuronidase, o espaço entre as células torna possível a penetração de outros componentes do veneno; portanto a hialuronidase é considerada "fator de difusão".

Além de ser o maior componente do veneno, seu peso molecular é de 41.000 (KEMENEY, et al 1984) e seu potencial de ativação ocorre em um pH entre 4,0 e 5,0 (HABERMANN, 1970). Na rainha, a quantidade de hialuronidase é maior que nas operárias

1.4. Fosfolipase A₂:

Esta enzima é responsável pela hidrólise do ácido graxo. A fosfolipase está presente em veneno de abelhas, escorpiões e serpentes, além de outros tecidos de mamíferos. Sua conformação peptídica é de 128 resíduos de aminoácidos (SHIPOLINI et al, 1979). Esta enzima destrói um dos principais blocos constituintes de todas as membranas biológicas, os fosfolípideos.

A fosfolipase do veneno de abelha é a mais ativa de todas as fosfolipases conhecidas (SHIPOLINI et al, 1971). É mais ativo até mesmo do que a fosfolipase de serpentes e do pâncreas de mamíferos, além de ser a principal responsável pelo choque anafilático. A eficiência da fosfolipase aumenta ainda mais com a presença da melitina (VOGT et al, 1970).

Acredita-se que a fosfolipase A-2 tem importante papel nas doenças inflamatórias, incluindo pancreatite aguda (NEVALAINEN, 1980).

1.5. Melitina:

É o principal componente do veneno de abelha. É um polipeptídeo de caráter hidrofóbico e por ser um detergente natural combina-se com lipídeos da membrana celular e faz a lise da membrana (DUFORC et al, 1986).

Também age ativamente com a fosfolipase A-2 e potencializa o efeito dessa enzima. A melitina possui propriedade sulfatante e anticoagulante (OWYANG et al, 1979).

A melitina também é capaz de lizar a membrana plasmática, facilitando a separação do núcleo intacto, com atividade transcricional (SMITH et al, 1988). Em tumores de rato a melitina é capaz de causar transformações das células neoplásicas (PIPPIA & COL, 1989).

1.6. Apamina:

É o menor peptídeo do veneno de abelhas, correspondendo a 2% de todo o peso do veneno puro. No entanto este peptídeo é um potente neurotóxico, capaz de combinar-se com membranas pós sinápticas e com mediadores químicos como K^+ e Ca^{+2} , em tecido nervoso (LAZDUNSKI, 1983).

Em coelhos ocorre resposta imune após a inoculação da Apamina livre ou associada à albumina (DEFENDINE & COLE, 1990).

1.7. Histamina:

Em veneno de abelha é encontrado pequena quantidade de histamina, porém, esta proteína é a responsável pela reação alérgica, causando as manchas vermelhas e inchaço no local da picada (REXOVA & MARKOVIK, 1963).

A liberação da histamina é mediada pela melitina e fosfolipase e por efeito citológico, causa degradação de mastócitos e com isto a liberação de histamina, causando choque anafilático (HIGGINPODHM R.D KARNELLA, 1971).

1.8. Secapina, Tertrapina, Procamina:

Esses três peptídeos também são componentes do veneno de abelha, porém alguns não são encontrados em todas as amostras e sua presença varia de acordo com a raça ou subespécie de *Apis mellifera*. A secapina contém 25 aminoácidos (GAULDIE et al, 1978; VLASAK et al, 1984).

O veneno de abelhas tem sido mencionado frequentemente na literatura como tendo efeitos farmacológicos, principalmente como anti-inflamatório e antiartrítico (Dotimas e Hyder, 1988).

O veneno de *Apis mellifera*, também tem sido utilizado na elucidação de mecanismos fisiológicos porque as substâncias que compõem esse veneno tem efeitos específicos sobre as diferentes estruturas que formam a célula. Nesse

sentido, em uma revisão de literatura nos trabalhos verificamos que, a cada ano, um número crescente de trabalhos é realizado utilizando-se o veneno de abelhas ou de suas frações, em estudos sobre aspectos específicos da fisiologia celular. Como exemplo podemos citar o trabalho de Smith et al. (1988) o qual observou que, a melitina, um dos componentes do veneno, pode desestabilizar a membrana de células em cultura, permitindo que os núcleos sejam isolados com a membrana nuclear intacta e com alta atividade transcriptacional.

Também é conhecido (Gerst e Salomon, 1987) o efeito antagonista da melitina sobre a calmodulina, um mediador envolvido na regulação e ligação do cálcio às proteínas do organismo. Os componentes do veneno também são utilizados (Drake e Hider, 1988) em estudos de ressonância magnética nuclear e em modelos de interação da membrana protéica.

1.9. EFEITO DO VENENO SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

Outros trabalhos tem sido realizados *in vitro* em culturas de células neoplásicas, objetivando conhecer melhor os mecanismos de reprodução celular. Verificamos que Spoerri (1983) já havia observado que a apamina tem efeito degenerador em culturas de neuroblastoma.

Também foi verificado (Hait et al., 1985) que a melitina inibe o crescimento de células leucêmicas, devido ao efeito inibidor da calmodulina. Esse efeito é novamente

mencionado por Lee and Hait (1985), que verificaram que a melitina é um dos mais potentes inibidores da calmodulina. Killion and Dunn (1986) também verificaram que as células leucêmicas são mais sensíveis aos efeitos citolíticos da melitina que as células normais. Foi ainda observado que células indiferenciadas tem um alto nível de receptores para a apamina, cerca de 50 vezes mais que as demais células (Schmid-Antomarchi et al., 1986). Ainda segundo Pippia et al (1989), a melitina é capaz de estimular a transformação de células neoplásicas de tumores, em ratos.

1.10. Citologia do tumor:

Os tumores benignos, geralmente, são bem diferenciados, porém as células são maiores e a aglomeração destas células em nódulos, revela a natureza de tumor.

Quanto aos tumores malignos a formação das células, variam desde bem diferenciadas a indiferenciadas. Com crescimento desigual, resultando em massas de tecido formado por células muito grandes e outras muito pequenas e multinucleadas com muita cromatina.

As alterações citológicas das células tumorais podem atingir o citoplasma com ou sem núcleo ou a célula como um todo. As células de tumor benignos tendem a ser maiores do que o normal, tem contorno irregular e forma bizarra e apresentam polimorfismo no tamanho. Células gigantes com vários núcleos e forma atípica, são comuns nos

cânceres com alto grau de malignidade. As alterações degeneradoras são frequentes tanto no citoplasma quanto no núcleo (1992).

O tumor utilizado em nosso trabalho tem morfologia líquida, células multinucleadas, tamanho desigual. O seu desenvolvimento no peritônio do camundongo resulta na morte do animal em um prazo de dez dias, embora em nosso trabalho, alguns indivíduos sobreviveram por treze dias. Com dez dias o tumor tem um aspecto hemorrágico.

Quando inoculado intramuscularmente, o tumor apresenta desenvolvimento de formato sólido, formando ulceração de cor vermelha, resultando na morte do animal em um prazo médio de quinze dias.

O aspecto do roedor é variado e depende do tempo de desenvolvimento do tumor. Após o sexto dia, o animal já apresenta abdômen dilatado porém movimenta-se com agilidade e alimenta regularmente. A partir do décimo dia o animal apresenta diarreia hemorrágica, respiração ofegante e movimenta-se com lentidão, morrendo em seguida. Este tumor se enquadra nas descrições para tumores de caráter maligno

Os cânceres com origem nos tecidos mesenquimais são denominados sarcomas (do grego *sarkos* = carnosos) pois possuem em geral pouquíssima estroma de tecido conjuntivo e, conseqüentemente, são carnosos. Como por exemplo, fibrossarcoma, lipossarcoma, leiomiossarcoma, para o caso de músculo liso (ROBINS, 1982).

O sarcoma utilizado nesse trabalho tem morfologia

líquida, células multinucleadas e citoplasma denso. Com grande proliferação em peritônio de camundongo, provoca a morte do animal em dez dias. Nesse período o tumor apresenta um aspecto hemorrágico.

1.11. Objetivo

Nosso trabalho teve como objetivo testar a ação do veneno de abelha no sarcoma TG 180, que desenvolve em peritônio de camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Implante do tumor.

Foram utilizados camundongos albinos fornecidos pelo Instituto Valee, sediado em Uberlândia-MG. Os animais são mantidos, durante o experimento, no biotério da UFU. No peritônio dos camundongos são implantadas células neoplásicas do tumor TG 180, fornecidos pelo Laboratório De Imunologia da UFU.

Essas células, que se desenvolvem em forma líquida, são retiradas com seringa esterilizada; Após sacrificar o camundongo portador, introduz-se a agulha e retira-se o tumor, que, além de líquido, tem leve viscosidade. A seguir, 1,0 ml do tumor é inoculado no peritônio do camundongo experimental, o qual é marcado com ácido picrico e separadas em portador e não portador, em

gaiolas distintas. As gaiolas são de plástico, medindo 0,5 m x 0,3 e 02 m de profundidade com tampa de metal em forma de grade e bebedouro. Todas as cobaias tem a mesma alimentação a partir de ração balanceada. O tratamento é feito com Apitoxina, peçonha extraída de *Apis mellifera*.

2.2. Extração Do Veneno:

O veneno utilizado neste trabalho é coletado segundo uma metodologia desenvolvida por Benton e Morse (1963) e aprimorada por Brandeburgo (1992) com algumas modificações (in Oliveira, 1994).

O sistema consiste na instalação frente a colméia, de uma armação de madeira dentro da qual fios de aço são esticados com espaçamento de 6 mm e sobre a qual é colocada uma placa de vidro. Um controlador de tempo dispara uma descarga elétrica de 8 volts a intervalos de 10 segundos.

As abelhas ao passarem pela placa, são estimuladas por choque elétrico e ferrom uma película de plástico, sendo o veneno depositado na superfície inferior da mesma. O veneno é líquido, mas depois de alguns minutos se cristaliza. O veneno é raspado do plástico e armazenado em recipiente de vidro escuro, em congelador.

O compartimento de coleta é totalmente fechado, o que permite que a operação seja realizada com segurança, uma vez que este método torna a colméia bastante defensiva. O recipiente de coleta, que é de vidro, fica envolto por

plástico, o que evita a contaminação do veneno.

Após coletado, o veneno é armazenado em recipiente de vidro de cor escura embrulhado com papel alumínio e guardado em congelador, no máximo por 3 dias .

2.3. Preparo do veneno:

Em balança de precisão, pesa-se de 0,002g de veneno cristalizado e diluído em 2ml de solução salina. Nessas condições é inoculado nas cobaias para a realização do experimento.

2.4. Contagem de células

Após a extração do tumor, já descrita em item anterior é feita a diluição, 1 ml de tumor em 10 ml de solução salina. Pipeta-se 50 microlitros para a contagem de células. Quando ocorre alta concentração de células, é necessário outra diluição. Obtendo uma concentração de 1 para 1000, é feita a leitura e aplicamos cálculos. O número de células contadas em câmara de Neubauer, é multiplicado pela diluição x a profundidade da câmara.

2.5. Experimentos

2.5.1. Experimento 1-1 (veneno inoculado após o implante do tumor).

Neste experimento o tratamento com veneno, por via intraperitoneal, é feito 24 horas após o implante do tumor e tem duração de três dias consecutivos. Trabalhamos com um número de dez camundongos, os quais são divididos em 3 grupos:

- Quatro camundongos que recebem tratamento com 0,003 g de veneno, via intraperitoneal após o implante do tumor.
- Quatro camundongos que sofrem o implante do tumor, mas não recebem tratamento com veneno.
- Dois camundongos que representam o grupo controle e não recebem nenhum tipo de tratamento, além de água e comida.

Este experimento foi repetido por duas vezes consecutivas (Experimentos 1.2 e 1.3).

2.5.2. Experimento 2 (tratamento com intervalo de 48h após o implante do tumor.)

Neste experimento são usados 10 camundongos.

Quatro camundongos, marcados na cabeça, são inoculados com tumor e 48h após começa o tratamento (3 doses), mantendo

o intervalo de 48h.

Quatro camundongos, marcados no dorso, apenas são inoculados, não recebendo tratamento com veneno.

Dois camundongos são mantidos como o grupo controle.

2.5.3. Experimento 3 (Veneno inoculado antes do implante do tumor com intervalo de 24 horas).

Neste experimento o tratamento é feito com uma dose de veneno 0,002g, que é inoculado por via intraperitoneal.

Quatro camundongos com marcas na cabeça são tratados com veneno diluído em 2 ml de solução salina, sendo inoculados 0,0005 ml por camundongos por via intraperitoneal. O tumor é implantado após a inoculação do veneno.

Quatro camundongos, marcados no dorso, são inoculados com tumor, mas não são tratados com veneno.

Dois camundongos são reservados para o grupo controle e a este não é dado qualquer tipo de tratamento, nem tumor.

Este experimento é repetido por duas vezes, nas mesmas condições Experimentos (3.2 e 3.3.)

2.5.4. Experimento 4 (Tratamento com intervalo de 48 horas, por via subcutânea e antes do implante do tumor e com contagem de células).

Quatro camundongos, marcados na cabeça são tratados periodicamente com um intervalo de 48 horas entre um dose e outra, num total de três doses. 48 horas após o último tratamento é feito o implante do tumor.

Quatro camundongos, marcados no dorso, recebem apenas o implante do tumor e não são tratados com o veneno.

Dois camundongos, marcados na barriga, são mantidos como controle e não recebem nem tratamento implante do tumor.

A partir desses experimentos a inoculação do veneno é por via subcutânea e não mais intraperitoneal.

É feita a contagem de células do tumor, retirado de camundongos tratados .

2.5.5. Experimento 4-1 (1ª Repetição)

Neste experimento é mantido o mesmo número de animais, e o mesmo método, porém a inoculação do veneno , por via subcutânea, é feita em locais diferentes no corpo do animal. Sendo realizada mais de uma repetição.

2.5.6. Experimento 4-2(Tem como objetivo fazer contagem de células).

Neste experimento é mantido o mesmo número de animais e o mesmo método de trabalho.

2.5.7. Experimento 5 (Observamos o desenvolvimento do tumor extraído de camundongos tratados e inoculados em outro camundongo sem tratamento com veneno).

Quatro camundongos marcados na cabeça são tratados periodicamente com veneno em intervalo de 48 horas, em um total de três doses. 48 horas após o último tratamento é feito o implante do tumor.

Quatro camundongos não são tratados e sofrem apenas o implante do tumor.

Dois camundongos, marcados na barriga são designados para o grupo controle.

2.5.8. Experimento 5-1 (Tumor proveniente de animais tratados x Tumor de animais não tratados).

Trabalhamos com dez camundongos sendo quatro marcados na cabeça, os quais recebem três doses de tratamento em intervalo de 48 horas entre uma e outra dose. O método de inoculação do veneno é mantido, por via subcutânea. Após 48 horas é feito o implante do tumor proveniente de camundongos não tratados. Quatro camundongos com marcas no dorso receberem tumor, o qual é proveniente

dos camundongos tratados no experimento 5. Dois camundongos, sem nenhum tipo tratamento além de água e alimento, são mantidos para o grupo controle.

2.5.9. Experimento 6 (Tumor originado de animais não tratados com veneno x tumor originado de animais tratados)

Neste experimento são testados tumores, retirados de camundongos tratados no experimento 5.

Quatro camundongos marcados na cabeça, e que não receberam nenhum tipo de tratamento são implantados com tumor retirado de camundongos tratados antes do implante do tumor.

Quatro camundongos marcados no dorso, e que também não receberam tratamento com veneno, são inoculados com tumor provenientes de camundongos tratados após o implante do tumor.

Dois camundongos, sem nenhum tipo de tratamento ou tumor, são mantido para o grupo controle.

2.5.10. Experimento 7 (Efeito do veneno sobre tumor originado de animais tratados com veneno).

Neste experimento são utilizados seis camundongos que são divididos em grupo marcados, com o objetivo de observar o efeito do veneno aplicado em um intervalos de 48

horas entre uma e outra dose, sobre animais inoculados com tumor retirado de animais tratados com veneno.

Quatro camundongos, marcados na cabeça, recebem tratamento com veneno com intervalo de 48 horas e com três aplicações. 48 horas após a última dose é feito o implante com tumor, proveniente de camundongos tratados.

Dois camundongos são mantidos sem tratamento e sem tumor, estes constituem o grupo controle.

2.5.11. Experimento 8 - (Tratamento com número variável de doses).

Também utilizamos dez camundongos:

Dois camundongos, marcados na cabeça, recebem 4 aplicações de tratamento com veneno, em intervalos de 48 horas.

Dois camundongos, marcados nas costas recebem tratamento em intervalos de 48 horas entre uma e outra dose, em um total de três doses.

Dois camundongos, marcados no dorso são tratados com duas doses, mantendo um intervalo de 48 horas entre elas.

Dois camundongos, marcados na barriga recebem apenas uma aplicação de tratamento.

Dois camundongos, sem nenhuma marca, são mantidos para o grupo controle. Todos os grupos recebem o implante do tumor após o tratamento, sendo que este experimento é

realizado por duas vezes consecutivas

2.5.12. Experimento 9: (Contagem de células de tumor em períodos diferentes de desenvolvimento em animais não tratados).

Estes experimentos são realizados com a finalidade de fazer a contagem de células, tendo sido utilizada a câmara de Neubauer.

- Oito camundongos serão utilizados nesse experimento.

- Dois camundongos sem marca são mantidos para o grupo controle.

- Seis dias após o implante, dois camundongos são sacrificados e é feita a contagem de células.

- Oito dias após o implante do tumor, dois camundongos são sacrificados para a contagem das células.

- Treze dias após o implante, os demais camundongos, são utilizados para a contagem de célula e como doadores de tumor para os camundongos do experimento seguinte.

2.5.13. Experimento 10 (O desenvolvimento do tumor extraído de animais com mais de 10 dias de inoculação).

Neste experimento é observado o desenvolvimento do

tumor inoculado em camundongo sem tratamento, porém, o tumor será extraído de camundongos que sobrevivem por treze dias após a inoculação. Assim sendo, seis camundongos sem tratamento recebem implante de tumor proveniente do experimento anterior. Os camundongos são marcados na cabeça.

3. RESULTADOS

No experimento 1.1. Os camundongos tratados após a inoculação do tumor com veneno sobreviveram em média 5 dias, enquanto que os não tratados porém portadores de tumor, viveram 12 dias . Os 2 camundongos pertencentes ao grupo controle permaneceram vivos e sem nenhuma doença .

Experimento 1.2. Os quatro camundongos tratados tiveram uma vida média de 3,5 dias enquanto que o prazo de vida dos não tratados foi de 13 dias. Não observamos alterações nos camundongos do grupo controle .

Experimento 1.3. Os quatros camundongos tratados sobreviveram um tempo médio de 5 dias e os não tratados sobreviveram em torno de 10 dias

Experimento 2. Os quatros camundongos tratados com veneno após o implante do tumor sobrevivem em média 12 dias porém o desenvolvimento do tumor foi mais lento em relação

ao desenvolvimento do tumor dos não tratados que sobrevivem por 9 dias.

Experimento 3.1. Os camundongos tratados 24 horas antes do implante tiveram vida média de 16 dias enquanto que os não tratados tiveram vida média de 10 dias.

Experimento 3.2. Os quatros camundongos tratados sobrevivem a um tempo médio de 7 dias e os não tratados sobreviveram em média 8 dias . Quanto ao grupo controle, não apresenta qualquer alteração de comportamento.

Experimento 3.3. O resultado obtido neste experimento foi de 8 dias para os tratados e 12 dias para os não tratados, em média .

Experimento 4. Os camundongos tratados com 48 antes do implante tiveram vida média de 16 dias, os não tratados tiveram vida médias de 12 dias, sendo que os 2 pertencentes ao grupo controle, permaneceram vivos.

Experimento 4.1 Foi comprovado que as injeções de veneno no mesmo local causavam lesões na pele dos camundongos. Portanto variamos o local das aplicações a cada tratamento.

Os camundongos tratados, neste experimento, sobreviveram um tempo médio de 14 dias, enquanto os não tratados sobreviveram um tempo médio de 10 dias

Experimento 4.2. Os camundongos tratados sobrevivem 18 dias e os não tratados 10 dias

**Contagem de células do tumor extraído de
camundongos tratados**

$$3,0 \times 10000 \times 1000 = 3,0 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

$$3,2 \times 10000 \times 1000 = 3,2 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

$$2,0 \times 10000 \times 1000 = 2,0 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

**Contagem de células do tumor extraído de animais
não tratados**

$$15 \times 10000 \times 1000 = 1,5 \times 10^8$$

$$15 \times 10000 \times 1000 = 1,5 \times 10^8$$

$$10 \times 10000 \times 1000 = 1 \times 10^8$$

Experimento 5. Os camundongos não tratados que sofreram implante de tumor proveniente de camundongos tratados permaneceram em observação por 1 mês sem que o tumor se desenvolvesse. Todos os camundongos tratados e que foram implantados com tumor proveniente de camundongos não tratados tiveram uma vida média de 18 dias .

Experimento 6. O tempo de sobrevivência dos camundongos que sofreram implante de tumor proveniente de animais previamente tratados foi significativamente maior. Dois camundongos sobrevivem três meses e um sobrevive 5 meses. Neste experimento uma fêmea que após ter sido inoculada com tumor ficou prenhe e teve 7 filhotes saudáveis.

Experimento 7. Por 4 meses e meio todos os camundongos

que sofreram inoculação de tumor oriundo de camundongos previamente tratados permaneceram sem manifestação do tumor. Os outros camundongos tratados que são inoculados com tumor proveniente de camundongos não tratados sobrevivem 19 dias.

Experimento 8. Nesse experimento os dois camundongos marcados na cabeça são tratados com veneno nos dias 04, 06, 08, e 10\10\94 e implantados com tumor nos dias 12\10\94.

Esses camundongos tratados com quatro doses de venenos morreram logo após a última dose de veneno, antes mesmo do implante do tumor.

Os dois camundongos tratados com três aplicações são os que sobrevivem por mais tempo. Tratados nos dias 04, 06 e 08\10\94, sobreviveram até o dia 02\11\94, ou seja, em torno de 25 dias.

Também estavam vivos até o dia 02\11\94, os camundongos com tratamento de 1 e 2 aplicações e o grupo controle, sem tratamento. Os animais controle, porém, apresentavam pouca mobilidade, sem disposição para alimentação, além de apresentarem grande dilatação do abdômen e sangramento nas fezes. Os dois não tratados foram sacrificados sendo um deles o doador de tumor para o experimento seguinte.

Na primeira repetição, dos dois camundongos tratados com 3 doses nos dias 05, 07, 11\12\94, apenas um sobreviveu até o dia 02\01\95.

Embora estando vivo, apresentava abdômen mais desenvolvido, sangramento nas fezes e indisposição para o alimento.

Os dois animais tratados nos dias 05, 07, e 09\1294, sobreviveram até o dia 02\01\95. Estes apresentam menor desenvolvimento do abdômen e maior disposição para se alimentar. Além desses animais também sobreviveram dois outros que são tratados com uma e duas aplicações, porém, esses apresentavam abdômen muito dilatado, sangramento nas fezes e indisposição para o alimento.

Na terceira e ultima repetição desse experimento, os camundongos que são tratados com 4 aplicações nos dias 16, 18, 20 e 22/01/95 foram implantados com tumor no dia 24\01\95.

Desses apenas um sobreviveu até o dia 05\02\95, porém apresentava quadro hemorrágico, pouca agilidade, além de ser o que apresentou maior dilatação do abdômen.

Em 05\02\95 o comportamento dos camundongos tratados nos dias 18 e 20\01\95, foi de maior agilidade com menor dilatação do abdômen, não apresentando quadro hemorrágico. Do grupo controle sobreviveu apenas um camundongos até o dia 05\02\95.

Experimento 9 (contagem de células de tumor)

Este experimento foi repetido por três vezes consecutivas. Consistiu em não aplicar qualquer tipo de tratamento, além de água e ração.

Tumor extraído com seis dias após o implante. São sacrificados três camundongos com os seguintes resultados:

$$16 \times 10000 \times 1000 = 1,6 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$14 \times 10000 \times 1000 = 1,4 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$11 \times 10000 \times 1000 = 1,1 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

-- **No oitavo dia após o implante do tumor:**

$$12,2 \times 10000 \times 1000 = 1,22 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$12 \times 10000 \times 1000 = 1,2 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$16,5 \times 10000 \times 1000 = 1,65 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

Treze dias após o implante do tumor:

$$- 1,5 \times 10000 \times 1000 = 1,5 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

$$1,25 \times 10000 \times 1000 = 1,25 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

Primeira repetição. São utilizados dois camundongos.

Tumor extraído com seis dias após o implante do tumor:

$$19,75 \times 10000 \times 1000 = 1,975 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$16,25 \times 10000 \times 1000 = 1,625 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

Dito dias após o implante do tumor:

$$14,75 \times 10000 \times 1000 = 1,475 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

$$15,0 \times 10000 \times 1000 = 1,5 \times 10^8 \text{ células/ml}$$

Tumor extraído com treze dias é utilizado apenas um camundongo.

$$1 \times 10000 \times 1000 = 1 \times 10^7 \text{ células/ml}$$

O tumor além de apresentar um número menor de células, as mesmas apresentavam tamanho reduzido.

Experimento 10. Neste experimento foi observado o desenvolvimento de tumor retirado de um camundongo que sobreviveu por treze dias. Assim sendo, seis camundongos sem tratamento receberam implante do tumor proveniente do experimento anterior. Este experimento foi repetido três vezes consecutivas, não havendo alterações no tempo médio de vida de 10 dias.

4. DISCUSSAO

Assim como é apresentado na introdução o veneno de abelhas é empregado em pesquisa farmacológicas com anti-inflamatório e no tratamento de tecidos neoplásicos.

Esta monografia apresenta resultados de experimentos realizados com veneno de abelhas *Apis mellifera* em camundongos portadores de tumor TG 180.

No inicio desse trabalho foram utilizados 0,003g de veneno diluido em 2ml de solução salina, sendo inoculado 0.0007g de veneno para cada 26 gramas de peso de camundongos. O tratamento consistiu de três aplicações consecutivas, diretamente no peritônio do camundongo, com início 24h após o implante do tumor.

Com este método os camundongos tratados sobrevivem um tempo médio inferior ao tempo médio de vida dos não tratados. Em algumas das repetições há casos em que as

animais morrem logo após a terceira dose do tratamento. Portanto, suspeitamos que a quantidade de veneno era alta. Para os demais experimentos a dosagem foi de 0,002g diluídas em 2ml de solução salina, sendo aplicados 0,0005g de veneno para cada 26g peso de camundongo. Foram mantidos os demais procedimento de tratamento

Supondo-se que 24h poderia corresponder a um intervalo pequeno, optamos por aplicar 0,0005g de veneno 48h após o implante do tumor, sendo mantido o intervalo de 48h entre uma e outra aplicação do tratamento, num total de três aplicações.

Embora a menor quantidade de veneno tenha aumentado o tempo de vida dos animais tratados, este método ainda não foi suficiente para superar o tempo de vida dos não tratados.

Numa tentativa de que o tempo de vida dos tratados fosse maior que o tempo de vida dos não tratados decidimos fazer o tratamento por via subcutâneo e antes da inoculação do tumor, aumentando também o período entre as aplicações do tratamento., Adotamos um intervalo de 48 horas em um total de três doses, com implante do tumor 48h após a última aplicação. Com este método o tempo médio de vida dos camundongos tratados superou o tempo médio de vida dos não tratados. Os camundongos não tratados vivem em média 10 dias nesse, período no qual o tumor já está hemorrágico, enquanto que os tratados vivem, em média de 16 dias, sendo que em alguns experimentos há casos em que 1 ou 2 camundongos que

sobreviveram por 25 dias e o tumor extraído não estava hemorrágico. Com a expansão do tumor, deve ocorrer obstrução de vasos capilares que resulta em sangramento.

Com repetidos experimentos foram detectadas lesões no local da aplicação. Por esse motivo é conveniente variar o local de aplicação do veneno.

Na contagem de células foi observado que havia um aumento de 5 vezes no número de células de tumor proveniente de camundongos não tratados em relação ao número de células de tumor proveniente de camundongos tratados. A partir de resultados de pesquisadores já citados na introdução, podemos levantar as seguintes hipóteses: ou o veneno atua como degenerador das células neoplásicas ou como estimulante do sistema imunológico do camundongo.

O experimento que consiste em inocular tumor extraído de camundongo previamente tratado foi o mais significativo de todos, porque o tempo médio de vida entre os tratados é de 5 meses, sendo que por 4 meses o animal não manifesta sintomas do tumor. Em uma dessas repetições uma fêmea que foi inoculado com tumor ficou prenhe e teve 7 filhotes saudáveis que foram amamentados normalmente. Essa fêmea sobreviveu por 5 meses, quando então apresentou dilatação do abdômen e ao ser sacrificada observou-se uma dilatação do intestino, sendo a quantidade de tumor extraído inferior a 0,5ml. A contagem de células foi feita sem diluição, obtendo 25 células no campo da câmara de Neubauer.

Tentando encontrar uma quantidade mínima para prolongar

O tempo de vida dos camundongos, e ao mesmo tempo, uma dosagem máxima suportada, foi feito o teste com um número variável de aplicações.

O teste com 4 aplicações resultou na morte dos camundongos mesmo antes da inoculação do tumor. O teste com três aplicações foi o que teve êxito pois além de tolerado pelos camundongos é o que prolonga o tempo médio de vida dos camundongos. O teste com 1 e 2 aplicações não teve efeitos significativo porque o tempo médio de vida foi igual ao tempo médio de vida dos não tratados.

Em uma das repetições verificamos, após o tratamento, que uma fêmea que havia sido tratada com três aplicações estava prenhe. Essa fêmea teve 6 filhotes com deficiência de crescimento e que morreram antes da aparecimento do pelo.

Em alguns experimentos há casos de animais que sobrevivem por treze dias e a quantidade de células extraídas desses animais é menor em relação à quantidade de células extraídas de animais que são sacrificados com oito dias após a inoculação do tumor. A progressão do tumor em camundongos não tratados é de 10 dias, independente de que as células sejam proveniente de camundongos portadores de tumor e que sobrevivem um tempo superior a 10 dias.

Também verificamos uma considerável diferença entre os números de células do tumor proveniente de animais tratados e não tratados. No entanto não foi realizado qualquer experimento para justificar esta variação. Spierri(1983) observou que Apamina tem efeito degenerador em cultura de

células meroblásticas. Hait (et al 1985) relata que a melitina tem efeito inibidor da calmodulina em células neoplásicas. Também verificamos que não haviam aparentemente diferenças morfológicas entre as células nos dois grupos.

Esta monografia apresenta resultados de testes realizados em organismos vivos, embora a maioria dos resultados apresentados pela literatura são de testes realizados in vitro. Neste trabalho o veneno de abelha *Apis mellifera* retardou o desenvolvimento do tumor, o que pode ser devido ao efeito direto do veneno sobre o tumor ou o veneno estaria induzindo uma resposta imunológica. No entanto não foram realizados testes a nível de reações imunológicas.

5. CONCLUSÕES

Foi comprovado que o veneno de *Apis mellifera* tem efeito inibidor sobre o tumor TG180.

Foi significativamente maior a sobrevivência dos camundongos tratados com três aplicações de 0,0005g de veneno antes da inoculação do tumor em relação aos animais não tratados e principalmente em relação aos tratados com 0,0007g de veneno

O tratamento com três aplicações com intervalos de 48h, com a quantidade de veneno de 0,0005g, apresenta resultados significativos pois o tempo médio de vida dos animais tratados supera em quase 100% o tempo de vida dos não tratados

Feita a contagem e a comparação entre a quantidade de células de tumor de animais tratados e não tratados observa-se um número menor de células do tumor de animais tratados

em relação as células de animais tumor não tratado

Camundongos não tratados com veneno quando inoculados com tumor extraídos de camundongos previamente tratados sobrevivem até 5 meses.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDERSSON. AND KISSAME. *PATOLOGIA*. Editora GANABARA. RJ. 7a Ed. pg 511.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. (1986). *Chemistry and pharmacology of honeybee venom*. In: *Venom of the hymenoptera*. Ed. T. piek. London: Academic Press, 329.
- BARKER, S. A. : BAYYUK, S. I.; BRIMACOMBE, J. S.; PALMER, D. J. (1963). *Characterization of the products of the action of the bee venom hyaluronidase*. *Nature*, 199: 693.
- BARNARD, J. H. (1973). *Allergic and parhologic finding in fifty insect sting fatalities*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 52: 259.
- BENTON, A. W.; MORSE, R. A. (1966). *Collection of the liquid fraction of the venom*. *Nature*, 210: 652.
- BRANDEBURGO, M. A. M. (1992). *A safe device for extrating from venom honeybees (Apis mellifera)*. *Bee World*, 73(3): 128.
- DEFENDINI, M. L.; BAHRAQUI, E. M.; LABRRJE-JULLIE, C.; REGNIER-VIGOUROX, A.; EL AYE, M.; VAN RIETSCHOTEN, J.;

- ROCHA, H.; GRANIER, C. (1990). Identification of antigenic residues on apamin recognized by polyclonal antibodies. *Molec. Immun.* 27: 37.
- DOTIMAS, E. M. (1986). Isolation, structure and action of bee venom components. University of Essex, UK: PhD. Thesis.
- DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E. P. (1953). In: *The proteins* (Neurath, H. and Bailey, K. Eds). I-A: 434.
- DRAKE, A. F.; HIDER, R. C. (1979). The structure of melittin in lipid bilayer membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 555: 371.
- DUFORC, E. J.; SMITH, I. C. P.; DUFOURCO, J. (1986). *Biochem.*, 25: 6448
- GAULDIE, J.; HANSON, J. H.; RUMJANEK, F. D.; SHIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. (1976). The peptide components of the venom. *European Journal of Biochem.*, 61: 369.
- GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; SHIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. (1978). The structure of some peptides from bee venom. *European Journal of Biochem.*, 83: 405.
- GERST, J. E.; SALOMON, Y. (1987). Inhibition by melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylate cyclase in M2R melanoma cells membranes. *Endocrinology.* 121(5): 1766.
- HABERMANN, E. (1957). Eigenschaften und Anreicherung der Hyaluronidase Von Bienengift. *Zeitschrift für Biochemie.* 329: 1
- HEBERMANN, E. (1958). Zur Wirkung tierischer gifte und von lysolecithin auf grenzflächen. *nZ. Gesante Exp. Med.*,

130: 19.

HABERMANN, E.; REIZ, K. G. (1965). *Biochem. Z.*, 341: 451.

HABERMANN, E.; JENTSCH, J. (1967). Sequenzanalyse des melittins aus den tryptischen und peptischen spaltstücken. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische chemie*, 348: 37.

HABERMANN, E.; KOWALLEK, H. (1970). Modification der amino gruppen und des tryptophans in melittin als mittee zur erkennung von struktur-wirkungs beziehungen. *Z. Physiol. Chem.*, 351: 884.

HABERMANN, E. (1972). Bee and wasp venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science*, 177: 314.

HAIT, W. N.; GRAIS, L.; BENZ, C.; CADMAN, E. C. (1985). Inhibition of grow of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phebenothiazines and melittin. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 14(3): 202.

HAUX, P.; SOWENTHAL, H.; HABERMANN, E. (1967). Sequenzanalyse des Bienegift-neurotoxins (Apamin) aus seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücke. *Z. Physiol. Chem.*, 348: 737.

HIDER, R.C.; KHADER, F.; TATHAM, A.S. (1983). Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. *Biochim. Biophys. Acta*, 778: 206.

HIGGINFODHM, R.D.; KARNELLA, S. (1971). The significance of the mast cell response to bee venom. *Journal Immunol.*, 106: 233.

- KAISER, E.; MICHL, H. (1958). *Die Biochemie der Tierischen Gifte*. Vienna: Deuticke.
- KEMENEY, D. M.; DALTON, N.; LAWRENCE, A. J.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A. (1984). The purification and characterization of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *European Journal of Biochem.*, 139: 217.
- Killion, J. J. and Dunn, J. D. (1986). Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139(1):222-227.
- KING, T. P.; SOBOTKA, A. K.; KOCHOUMAIN, I.; LICHTENSTEN, L. M. (1976). Allergens of honey bee. *Arch. of biochim. and biophys.*, 172: 661.
- LAZDUNSKI, M. (1983). Apamin a neurotoxin specific for one class of calcium-dependent potassium channels. *cell calcium*, 4: 421.
- LEE, G. L. and HAIT, W. N. (1985). Inhibition of growth of c6 astrocytoma cells by inhibitors of calmodulin. *Life Sci.*, 36(4)347-354.
- NEVALAINEN, T. L. (1980). The role of phospholipase A2 in acute pancreatitis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 15: 641.
- OLIVEIRA, F. 1994. *Caracterização Bioquímica Parsial Presente no Veneno de abalás Apis mellifera*. Monografia

- OUYANG, C.: LIN, S.C.: TENG, C.M. (1979). Anticoagulant properties of *Apis mellifera* (honey bee) venom. *TOXICON*, 17: 197.
- OWEN, M. D.: BRAIDWOOD, J. L. (1974). A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.) venom. *Canadian Journal of Zoology* 52: 387.
- OWEN, M. D. (1979). Relationship between age and hyaluronidase activity in the venom of queen and worker bees *Apis mellifera*. *Toxicon*, 17: 94.
- PECK, M. L.: O'CONNOR, R. (1974). Procaine and other basic peptides in the venom of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 22: 51.
- PIPPIA, P.: SCIOLA, L.: MELONI, M. A.: BARNI, S.: TILLOCA, G. (1989). Adesione cellulare in fibroblasti di ratto; effetto dei tumor promoters. *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 65(5): 453.
- PIPPIA, P.: SCIOLA, L.: MELONI, M. A.: BARNI, S. and TILLOCA, G. (1989). ADESIONE CELLULARE IN FIBROBLASTI DI RATTO; EFFETTO DEI TUMOR PROMOTERS. *BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER.*, 65(5):453-460.
- REXOVA, L.: MARKOVIC, O. (1963). Chemical characterization of some low-molecular components of honey bee venom. *Chemické Zvesti*, 17: 884.
- RICHES, H. R. C. (1982). Hypersensitivity to bee venom. *Bee world*, 63: 7.

- ROBBINS AND. STANLEY M.D (1986). **Patologia estrutural e funcional**. R J. editora GUANABARA. 3a ed. pg 208a 220
- SLANLEY L. ROBBINS; RAMZI S. CANTRAN; VIMAY KUMAR: **Patologia clinica** (1991).
- SHIPOLINI, R. A.; BRADBURY, A. F.; CALLEWAERT, G. L.; VERNON, C. A. (1967). **The struture of apamin**. *Chem. commun.*, 679.
- SHIPOLINI, R. A.; CALLEWAERT, G. L.; COTTERELL, R. C.; DOONAN, S.; VERNON, C. A.; BANKS, B. E. C. (1971). **Phospholipase a from bee venoms**. *European Journal of Biochem.* 20: 459.
- SHIPOLINI, R. A.; CALLEWAERT, G. L.; COTTREL, R. S.; COONAN, S. VERNON, C. A. (1979). **The amino acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A2 from bee venom**. *Europe journal biochem.*, 48: 465.
- SCHMID-ANTOMARCHI, H.; HUGUES, M. AND LAZDUNSKI, M. (1986). **Properties of the apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺channel in PC 12 pheochromocytoma cells which hyper-produce the apamin receptor**. *J. Biol. Chem.*, 261(19):8633-8637.
- SMITH, P. J.; FRIED, M. H.; SCOTT, B. J.; VON HOLT, C. (1988). **Isolation of nuclei from melittin-destabilized cell**. *Anal Biochem.*, 162: 390.
- SPOERRI, P.E. (1983). **Changes induced by apamin from bee venom on differentiated mouse neuroblastoma cells in culture**. *Acta Anat. (Basel)* 117(4):346-354.

- VALASK, R.; UNGER-LULLMANN, C.; KRIEL, G.; FRISCHAUF, A. M. (1983). Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honey bee pre-promelittin. *European Journal of Biochem.* 135: 123.
- VALASAK, R.; KRIEL, G. (1984). Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preposecapin, a major product of queen-bee venom gland. *European Journal of Biochem.* 145: 279.
- VOGT, W.; PATZER, F; LEGE, L.; OLDIGS, H.; WILLE, G. (1970). Synergism between phospholipase A and various peptides and SH-reagents in causing hameolysis. *Naunyn-schamiedebergs Archiv fur pharmakologie*, 265: 442.

ANEXOS

Tabela 1: Tempo de sobrevivência de camundongos portadores de sarcoma TG180 tratados e não tratados.

Experimentos	Tempo de Sobrevivência		Quantidade de veneno	Intervalo de Tempo (h)
	Animais Tratados	Não Tratados		
1 - 1	5 dias	12 dias	7×10^{-4}	24 h após
1 - 2	3 dias	13 dias	7×10^{-4}	24 h após
2 - 1	5 dias	10 dias	7×10^{-4}	24 h após
2 - 2	7 dias	8 dias	5×10^{-4}	24 h antes
2 - 3	12 dias	9 dias	5×10^{-4}	48 h antes
3 - 1	16 dias	10 dias	5×10^{-4}	24 h antes
3 - 2	7 dias	8 dias	5×10^{-4}	24 h antes
3 - 3	8 dias	10 dias	5×10^{-4}	24 h antes
4	16 dias	12 dias	5×10^{-4}	48 h antes
4 - 1	14 dias	10 dias	5×10^{-4}	48 h antes
4 - 2	18 dias	10 dias	5×10^{-4}	48 h antes