

## EFEITO DO VENENO DE ABELHAS *A. mellifera* NO DESENVOLVIMENTO DE TUMOR

### THE EFFECT OF *A. mellifera* BEE VENOM ON TUMOUR DEVELOPMENT

Ana Paula MANTOVANI<sup>1</sup>; Edimilsa Socorro ARAÚJO<sup>2</sup>; Malcon Antônio Manfredi BRANDEBURGO<sup>3</sup>

**RESUMO:** A imunoterapia aplicada a doenças neoplásicas é baseada na observação de que as células de tumores malignos possuem antígenos de membrana diferentes daqueles encontrados nas células normais em tecidos correspondentes. O veneno de abelhas *Apis mellifera*, possuindo componentes de alto peso molecular, estimula o sistema imunológico e é considerado um potente alergeno, podendo portanto atuar como imunoterápico. Assim sendo, o objetivo do trabalho foi verificar o efeito da aplicação do veneno de abelhas, inoculado antes ou após o implante do tumor TG-180 na cavidade peritoneal, no desenvolvimento de tumor em camundongos Swiss. Os animais foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi tratado com aplicações subcutâneas de veneno diluído em salina; o segundo grupo foi tratado com salina e o terceiro não tratado. Quarenta e oito horas após o tratamento, o tumor foi inoculado nos camundongos. Após dez dias, o tumor foi puncionado para a contagem do número de células neoplásicas. Numa segunda etapa, a inoculação do veneno foi realizada 48 horas após o implante do tumor, sendo o veneno aplicado por via intraperitoneal e subcutânea. A análise dos resultados seguiu o mesmo procedimento. Com a pré-inoculação do veneno, um número menor de células neoplásicas foi observado na cavidade peritoneal dos animais, enquanto os tratamentos com veneno, após a inoculação do tumor, não apresentaram atividade antitumoral significativa.

**UNITERMOS:** *Apis mellifera*, Veneno, Imunoterapia

O estudo da imunoterapia em neoplasias é baseado na observação de que células de tumores malignos possuem antígenos de membrana diferentes daqueles encontrados nas células dos tecidos normais correspondentes (BALDWIN; PRICE, 1975). O veneno de abelhas *Apis mellifera*, possuindo componentes de alto peso molecular (RICHES, 1982; DOTIMAS; HIDER, 1987), estimula o sistema imunológico (Irsch et al., 1999), podendo portanto atuar como imunoterápico (TEXIER et al., 2000).

Além da resposta imunológica, alguns componentes do veneno possuem outras propriedades farmacológicas específicas, entre elas propriedades antitumorais. A melitina, por exemplo, é um dos mais potentes inibidores da calmodulina, o que lhe confere a capacidade de inibir o crescimento das células leucêmicas, as quais são mais sensíveis aos efeitos citolíticos da melitina que as células normais (HAIT et al., 1985). As células indiferenciadas possuem um nível de receptores para a apamina cerca de 50 vezes maior do que as demais

células (SCHIMID-ANTOMARCHI et al., 1986), o que explica o efeito degenerador da apamina em cultura de neuroblastoma (SPOERRI, 1983).

Nesse trabalho procuramos analisar os efeitos do veneno de abelhas *Apis mellifera*, como agente imunoterápico e antitumoral, em camundongos Swiss inoculados com tumor TG-180. Esse tumor ocorre em forma líquida na cavidade abdominal de camundongos. Os animais apresentam o abdomen distendido a partir do sexto dia de desenvolvimento do tumor, sobrevivendo aproximadamente 15 dias (ARAÚJO; BRANDEBURGO, 1995). Células tumorais TG-180 podem ser mantidas em laboratório, por meio de cultivo in vivo. Para tanto, células tumorais são implantadas no peritônio de camundongos e, após um período de 10 dias, os animais são sacrificados e suas células tumorais puncionadas com seringa esterilizada. Desse material, 1 ml é implantado em camundongos sadios para a indução de novos tumores.

O veneno foi coletado segundo técnica desenvolvida por BENTON; MORSE (1963) e

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia

<sup>3</sup> Professor do Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

modificado por BRANDEBURGO (1992), e consiste em estimular as abelhas com uma descarga elétrica. Assim estimuladas, as abelhas ferream uma película de plástico onde fica depositado o veneno, o qual, após alguns minutos, cristaliza, sendo então raspado com uma espátula e conservado no congelador a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Numa primeira etapa foi estudado o efeito da pré-aplicação do veneno em camundongos Swiss, machos, adultos, de linhagem não isogênica, com 7 a 10 semanas de idade, com peso entre 22 a 30 gramas. Os animais foram divididos em três grupos de seis camundongos. O primeiro grupo foi tratado com 3 aplicações subcutâneas de 0,1mg de veneno diluído em salina na proporção de 1:1 (mg/ml), em intervalos de 48 horas; o segundo grupo foi tratado com 3 aplicações de 0,1ml de salina também em intervalos de 48 horas e o terceiro grupo foi o controle. Após 48 horas do pré-tratamento, os animais foram inoculados com 0,5ml de células de tumor por via intraperitoneal. No décimo dia de desenvolvimento do tumor, foram puncionados 100 $\mu\text{l}$  de tumor para a contagem do número de células na câmara de Neubauer.

Numa segunda etapa foi estudado o efeito do veneno, inoculado por via intraperitoneal, após o implante do tumor. Os camundongos foram divididos em três grupos de seis animais nos quais foi inoculado 0,5 ml de células de tumor. Após 48 horas da inoculação do tumor, o primeiro grupo foi tratado com uma aplicação intraperitoneal de 0,1mg de veneno diluído em salina na proporção de 1:1 (mg/ml), enquanto o segundo grupo foi tratado com uma aplicação intraperitoneal de 0,1 ml de salina. O terceiro grupo, o controle, não recebeu nenhum tratamento.

Numa terceira etapa foi estudado o efeito do pós-tratamento com veneno, inoculado por via subcutânea, em animais com tumor já implantado. Os camundongos foram divididos e inoculados com o tumor da mesma forma que no experimento anterior. O primeiro grupo foi tratado com 3 aplicações de 0,1mg de veneno diluído em salina na proporção de 1:1 (mg/ml), em intervalos de 48 horas. O segundo foi tratado com 3 aplicações de 0,1 ml de salina, também em intervalos de 48 horas. O terceiro grupo foi o controle. No décimo dia foram puncionados 100  $\mu\text{l}$  de tumor para a contagem do número de células tumorais.

Na análise dos resultados obtidos na primeira etapa, quando foi estudado o efeito da pré-aplicação do veneno nos camundongos portadores de tumor, foram obtidas médias de  $16,9 \times 10^7$ ;  $58,5 \times 10^7$  and  $53,2 \times 10^7$  células/ $\text{mm}^3$  para o grupo tratado com veneno, salina e controle, respectivamente. Assim, o número médio de células/ $\text{mm}^3$  foi menor em camundongos pré-tratados com

veneno quando comparado com os animais tratados com salina e o controle. Nesse caso, o pré-tratamento com veneno por via subcutânea apresentou resultados positivos, com redução no número de células tumorais. Isso explica resultados anteriores (ARAÚJO & BRANDEBURGO, 1995), quando foi verificado que animais tratados com veneno, antes do implante do tumor, apresentaram um tempo de sobrevivência maior. CURIC et al. (1992) obtiveram resultados semelhantes em experimentos com carcinoma mamário, o qual teve o crescimento inibido quando implantado em camundongos que haviam sido inoculados com veneno de abelhas e em metástases de pulmão, que apresentaram desenvolvimento significativamente menor em camundongos também pré-tratados com veneno de abelhas. Esses resultados poderiam ser explicados pela resposta imunológica contra o tumor, induzida pelo veneno. Esse efeito imunoterápico do veneno tem sido observado (TEXIER et al., 2000) e, de maneira mais específica, SCHIMID-ANTOMARCHI et al. (1986) mostraram que o veneno modifica a estrutura dos receptores de membrana das células do tumor, tornando-as mais sensíveis aos fatores anti-tumorais.

Na análise dos resultados obtidos no estudo do efeito anti-tumoral do veneno, com inoculação intraperitoneal do veneno após o implante do tumor, foi observado que o número médio de células tumorais para animais tratados com veneno foi de  $64,7 \times 10^7$ . Para os animais tratados com salina o número de células obtido foi de  $46,1 \times 10^7$ . No tratamento com veneno inoculado por via subcutânea após a inoculação do tumor, o número médio de células obtido para os animais tratados com veneno foi de  $38,8 \times 10^7$ ; para os animais tratados com salina o número médio de células foi de  $22,4 \times 10^7$ . O controle, comum para os dois tratamentos, apresentou o número médio de células de  $73,5 \times 10^7$ .

Os tratamentos com veneno inoculado após o implante do tumor, não apresentaram resultados significativos, principalmente quando comparados aos resultados observados no tratamento com salina. Assim, não foi possível observar uma atividade antitumoral específica do veneno, embora em outros trabalhos tenha sido verificado uma atividade anti-tumoral de alguns componentes do veneno, como a melitina (HAIT et al., 1985) e a apamina (SPOERRI, 1983; SCHIMID-ANTOMARCHI et al., 1986).

Considerando os resultados obtidos, o pré-tratamento com veneno parece indicar um possível efeito imunoterápico contra o tumor, enquanto o pós-tratamento com veneno não apresentou resultados significativos.

**ABSTRACT:** The neoplasias immunotherapeutic treatment is based on the demonstration that tumour cells possess membrane antigens different from those found in cells of corresponding normal tissue. On the other hand the venom of bee *Apis mellifera* is considered a potent allergen. Thus, the objective of this research was analyse the effects of bee venom inoculation before and after of implants of the tumour TG-180 in the peritoneum cavity of mice Swiss. The animals were divided in 3 groups. The first was pre-treated with subcutaneous applications of venom diluted in saline; the second was treated with saline and the third non treated. Forty eight hours after treatment, the tumour was inoculated in all the animals. Later the tumour was punctured for score of neoplastic cells. In the second stage the venom inoculation was done forty eight hours after implanting of the tumour and the analysis of the results followed the same procedure. In the pre-inoculation with venom, a lower number of neoplastic cells was observed in the peritoneal cavity of the animals, while the treatment after tumour implants did not showed antitumoural significant results.

**UNITERMS:** *Apis mellifera*, Venom, Immunotherapy.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E. S., BRANDEBURGO, M. A. M. Efeito biológico do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) sobre o sarcoma TG-180. **Anais da 2.<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC**, realizada em Cuiabá, 1995, pg.331.

BALDWIN, R. W., PRICE, M. R. **Neoantigen Expression in Chemical Carcinogenesis**. In: BECKER, F. F. **Cancer: A Comprehensive Treatise**. Plenum Press, New York, 1975, p. 353 - 383.

BENTON, A. W.; MORSE, R. A. Collection of the liquid fraction of the venom. **Science**, v. 142, p. 228-230, 1963.

BRANDEBURGO, M. A. M. A safe device for extracting from venom honeybees (*Apis mellifera*). **Bee World**, p. 128-130, 1992.

CURIC, S., TADIC, Z., VALPOTIC, I., SULIMANOVIC, D., BASIC, I. The effect of bee venom on tumour growth and metastasis formation of mammary carcinoma in CBA mice. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb - Republic of Croatia, v. 62, p. 31-35, 1992.

DOTIMAS, E. M., HIDER, R. C. Honeybee venom, **Bee World**, v. 68, p. 51-70, 1987.

HAIT, W. N.; GRAIS, L.; BENZ, C.; CADMAN, E. C. Inhibitions of grow of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phebenothiazines and melittin. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.14(3), p.202-205, 1985.

IRSCH, J.; KONIG, C.; LOHNDORF, A.; TESCH, H.; KRIEG, T.; MERK, H.; RADBRUCH, A.; HONZELMANN, N. IgE and T-cell responses to high-molecular weight allergens from bee venom. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29(3), p. 394-401, 1999.

RICHERS, H. R. C. Hypersensitivity to bee venom. **Bee World**, v. 63(1), p. 7-22, 1982.

SCHIMID-ANTOMARCHI, H.; HUGUES, M.; LAZDUNSKI, M. Properties of the apamin-sensitive Ca-activate K-channel in PC 12 pheochromocytoma cells which hyperproduce the apamin receptor. **Journal Biol. Chem.**, v.261(19), p. 8633 - 8637, 1986.

SPOERRI, P. E. Changes induced by apamin from bee venom on differentiated mouse neuroblastoma cells in culture. **Acta Anat.** 117, p. 346-354, 1983.

TEXIER, C.; POUVELLE, S.; BUSSON, M.; HERVE, M.; CHARRON, D.; MENEZ, A.; MAILLERE, B. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. **Journal of Immunology** (Baltimore), v. 164(6), p. 3177-3184, 2000.