



**Universidade Federal  
de Campina Grande**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GESTÃO E  
SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS**

**ALINE GUIMARÃES CARVALHO**

**ESTUDO SOBRE A UTILIZAÇÃO DA APITOXINA DE *Apis Mellifera* NA  
ARTRITE INDUZIDA EM RATOS *WISTAR***

**POMBAL-PB  
2020**

**ALINE GUIMARÃES CARVALHO**

**ESTUDO SOBRE A UTILIZAÇÃO DA APITOXINA DE *Apis Mellifera* NA ARTRITE  
INDUZIDA EM RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar-CCTA da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, campus Pombal-PB, como parte das exigências para obtenção do título em Mestre em Sistemas Agroindustriais.

**Orientadores:**

D.Sc. Patrício Borges Maracajá

D.Sc. Aucelia Cristina Soares de Belchior

C331e Carvalho, Aline Guimarães.  
Estudo sobre a utilização da apitoxina de *Apis Mellifera* na artrite induzida em ratos *Wistar* / Aline Guimarães Carvalho. – Pombal, 2020.  
64 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2020.  
“Orientação: Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá”.  
“Coorientação: Profa. Dra. Aucelia Cristina Soares de Belchior”.  
Referências.

1. Apitoxina - Aplicabilidade terapêutica. 2. Artrite de joelho. 3. Inflamação. 4. Dor. 5. Veneno de abelha. 6. Tratamento. I. Maracajá, Patrício Borges. II. Belchior, Aucelia Cristina Soares de. III. Título.

CDU 638.12(043)

**ALINE GUIMARÃES CARVALHO**

**ESTUDO SOBRE A UTILIZAÇÃO DA APITOXINA DE *Apis Mellifera* NA ARTRITE  
INDUZIDA EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar-CCTA da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, campus Pombal-PB, como parte das exigências para obtenção do título em Mestre em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 02 de março de 2020.



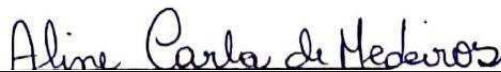
---

Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá PPGHT/CCTA/UFCG  
(Orientador)



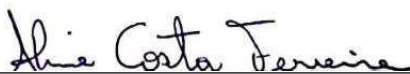
---

Profa. Dra. Aucelia Cristina Soares de Belchior PPGHT/CCTA/UFCG  
(2º Orientador)



---

Profa. Dra. Aline Carla de Medeiros PPGHT/CCTA/UFCG  
(Examinador interno)



---

Profa. Dra. Aline Costa Ferreira  
(Examinador externo)

**POMBAL-PB  
2020**

A Deus, em primeiro, e a Virgem Maria Santíssima por proporcionar superação de dificuldades, ajudando-me a vencer barreiras.

A minha Família em especial a minha mãe e minhas filhas que contribuíram para concretização desse sonho!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me deixar cair diante das dificuldades enfrentadas e que sempre segurou a minha mão nos momentos que pensei em desistir.

As minhas filhas Ana Clara e Alexia, alicerce da minha vida. Foi por elas, e é para elas que dedico as minhas conquistas.

A minha mãe Maria do Socorro, exemplo de mulher guerreira, fiel a Deus, companheira que sempre cuidou das minhas filhas com fosse suas e ao meu pai Antônio Guimarães por sempre contribuir nos meus planos pessoais e profissionais.

Aos meus irmãos, Amanda e José que sempre estiveram comigo em todos os momentos, obrigada pelo apoio, e ao meu esposo André por todo companheirismo ao longo dos anos.

A minha tia Da paz que é uma segunda mãe para minhas filhas, gratidão em dedicar seu tempo a elas.

As minhas amigas: Ednilda Firmino, Rosângela Maria, Polianne Brito e Manuela Carla por todo apoio e amizade, é muito bom saber que sempre posso contar com vocês.

A Universidade Federal de Campina Grande em especial ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e agroindústria e ao Centro Universitário de Patos (UNIFIP) pela oportunidade de realizar esse sonho.

Aos meus orientadores: professor Dr. Patrício Borges Maracajá, por sua disposição na realização da pesquisa, exemplo de ser humano, obrigada por acreditar no meu potencial. A minha outra orientadora Aucelia Cristina Belchior por todo apoio na pesquisa, levarei seus ensinamentos sempre.

Aos demais membros da banca, Aline Carla de Medeiros no qual o contato foi breve, mas suficiente para mostrar a pessoa humana e empática, e Aline Costa Ferreira, agradeço pela aceitação ao convite de participar e fazer parte desse momento da minha vida.

Ao Núcleo de Extensão e Pesquisa (NUPE), em especial aos que o compõe: Roberta Micheline, Márcio, Luciano e Elizabeth, muito obrigada pelo apoio durante a pesquisa.

Gratidão aos meus alunos (Pamala, Maria de Fátima, Welligton, Paulo, Sebastião Mateus, Elisângela, Jair, Francisco, Helyson, Matheus Clementino, Francisco e Gabriela) que estiveram comigo durante toda a coleta.

Quero também agradecer ao farmacêutico Alysson e aos nobres colegas da UNIFIP, como os professores Margareth, Neto e Alexandre pela grande contribuição em conhecimento nas suas áreas profissionais, que enriqueceram a pesquisa.

A vocês, meu muito obrigada!

*E disse-me: A minha graça te basta, porque o meu poder se aperfeiçoa na fraqueza. De boa vontade, pois, me gloriarei nas minhas fraquezas, para que em mim habite o poder de Cristo. Por isso sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades, nas perseguições, nas angústias por amor de Cristo. Porque quando estou fraco então sou forte.*

*(2 Coríntios 12:9,10)*



CARVALHO, Aline Guimarães. **Estudo sobre a utilização da apitoxina de *Apis Mellifera* na artrite induzida em ratos *Wistar***. 2020. 66 p. Dissertação (Mestrado em Gestão e Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Pombal-PB, 2020.

## RESUMO

A apitoxina é um produto secretado pelas abelhas da espécie *Apis Mellifera*, cujo objetivo é proteger a colônia contra predadores presentes próximos ou nas colmeias. Essa substância é secretada através de glândulas de secreção ácida e de secreção alcalina, encontrada no interior do abdômen das abelhas operárias. O seu potencial terapêutico está relacionado às atividades: Neuroprotetor, radioprotetor, cicatrizante, antitumoral, anti-inflamatório e anti-nociceptivo/analgésico, no qual se enquadra a artrite reumatoide (AR). A AR é uma patologia autoimune, ainda de etiologia desconhecida, caracterizada com quadro algico e inflamatório e por acometimento de várias articulações periférica, apresenta-se de forma simétrica que leva à deformidade e à destruição das articulações em decorrência da erosão óssea e da cartilagem. Nesta pesquisa, o objetivo foi verificar as ações anti-inflamatória e anti-nociceptiva da apitoxina de *Appis Mellifera* sobre a artrite de joelho, induzidas em ratos *wistar*. Trata-se de uma pesquisa experimental, de caráter quantitativo, onde se tem um estudo populacional exposto a um determinado protocolo de tratamento. A pesquisa foi desenvolvida no Centro de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Campina Grande, campus Pombal– PB em parceria com o Núcleo de Pesquisa Experimental do Centro Universitário de Patos - UNIFIP e o laboratório de Biomedicina BIOLAB – UNIFIP. Para esta pesquisa, foram utilizados 50 ratos *Wistar*, oriundos do biotério do Núcleo de Pesquisa Experimental - NUPE, onde foram dispostos em 5 grupos, sendo com 10 ratos em cada: GRUPO I- Variável de Controle (C1 a C10); GRUPO II- Artrítico induzido A (A1 a A10)- artrítico induzido sem tratamento posterior; GRUPO III- Artrítico induzido X (X1 a X10) - Com tratamento através de exercício variável; GRUPO IV- Artrítico induzido Y (Y1 a Y10) - Com tratamento utilizando apitoxina; GRUPO V- Artrítico induzido Z (Z1 a Z10) - Com tratamento utilizando apitoxina e exercício variável. Conclui-se que os grupos IV e V, apresentaram melhores resultados na nocicepção e inflamação. O grupo IV apresentou destaque nas variáveis de edema, com média de  $1,14 \pm 0,2$  e ausência de 90% do rubor nos animais. Outra variável observada foi o calor no qual o grupo III, 100% dos animais apresentaram ausência da hipertermia em comparação ao grupo IV com 90%. As medidas de dor e rigidez os grupos III, IV e V alcançaram resultados mais efetivos com destaque para os grupos IV e V com dor leve em 70% e normal 30%, já na rigidez a ausente ficou presente em 30% no grupo IV e 12,5% no grupo V. E, por fim, com relação ao exame laboratorial, mais precisamente a Proteína C Reativa o grupo IV apresentou maior efeito na diminuição da inflamação em comparação aos demais. Apesar dos resultados positivos, é recomendável novas pesquisas com condutas (exercícios e formulações variadas) para resolutividade da patologia em curto tempo.

**Palavras-chave:** Inflamação. Dor. Veneno de abelha. Tratamento.

CARVALHO, Aline Guimarães. **Study on the use of the *Apis Mellifera*'s apitoxin in induced arthritis in Wistar rats.** 2020. 66 p. Dissertation (Masters in Gestão e Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Pombal-PB, 2020.

### ABSTRACT

Apitoxin is a product secreted by the bees of the species *Apis Mellifera*, whose objective is to protect the colony against predators present near or in the hives. This substance is secreted through glands of acid secretion and alkaline secretion, found inside the abdomen of worker bees. Its therapeutic potential is related to the activities: Neuroprotective, radioprotective, healing, anti-tumor, anti-inflammatory and anti-nociceptive / analgesic, which includes rheumatoid arthritis (RA). RA is an autoimmune pathology, still of unknown etiology, characterized by pain and inflammation and by the involvement of several peripheral joints, it presents itself in a symmetrical way that leads to deformity and destruction of the joints due to bone and cartilage erosion. In this research, the objective was to verify the anti-inflammatory and anti-nociceptive actions of *Apis Mellifera*'s apitoxin on knee arthritis, induced in *wistar* rats. It is an experimental research, of a quantitative character, where a population study is exposed to a specific treatment protocol. The research was developed at the Agroindustrial Science and Technology Center of the Federal University of Campina Grande, Pombal Campus – PB in partnership with the Experimental Research Center of the University Center of Patos - UNIFIP and the Biomedical Laboratory BIOLAB - UNIFIP. For this research, 50 *Wistar* rats were used, coming from the vivarium of the Experimental Research Center – NUPE, where they were arranged in 5 groups, with 10 rats in each: GROUP I - Control Variable (C1 to C10); GROUP II - Arthritic induced A (A1 to A10) - arthritic induced without further treatment; GROUP III- Arthritic induced X (X1 to X10) - With treatment through variable exercise; GROUP IV - Y-induced arthritic (Y1 to Y10) - With treatment using apitoxin; GROUP V- Z-induced arthritic (Z1 to Z10) - With treatment using apitoxin and variable exercise. It is concluded that groups IV and V, presented better results in nociception and inflammation. Group IV showed prominence in the edema variables, with a mean of  $1.14 \pm 0.2$  and absence of 90% of flushing in the animals. Another variable observed was the heat in which group III, 100% of the animals showed absence of hyperthermia compared to group IV, with 90%. The measures of pain and stiffness in groups III, IV and V achieved more effective results, with emphasis on groups IV and V with mild pain in 70% and normal 30%, whereas in stiffness the absent was present in 30% in group IV and 12.5% in group V. In addition, finally, regarding the laboratory examination, more precisely, the Reactive Protein C group IV had a greater effect in reducing inflammation compared to the others. Despite the positive results, further research with conducts (exercises and varied formulations) is recommended for resolving the pathology in a short time.

**Keywords:** Inflammation. Ache. Bee poison. Treatment

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – População e amostra em: (A) gaiolas de polipropileno, com separação de grupos; (B) identificação da amostra com ácido pícrico..... 25
- Figura 2** – Avaliação da amostra: (A) comprimento; (B) peso; (C) temperatura; (D) medição da articulação do joelho..... 28
- Figura 3** – Indução da artrite: (A) base da cauda; (B) articulação tibiofemoral; (C) articulação após a finalização do protocolo de indução..... 29
- Figura 4** – Administração, por via intraperitoneal da ketamina® a 10% na dose e xilazina® a 2%: (A) quadrante inferior direito; (B) aplicação dos anestésicos..... 30
- Figura 5** –Punção intracardíaca para análise hematológica..... 30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabelas 1</b> – Média e Desvio Padrão (DP) do peso dos ratos nas 7 medidas realizadas.....	34
<b>Tabela 2</b> – Média e Desvio Padrão (DP) do comprimento dos ratos nas 7 medidas realizadas.....	35
<b>Tabela 3</b> – Média e Desvio Padrão (DP) da temperatura dos ratos nas 7 medidas realizadas.....	36
<b>Tabela 4</b> – Média e Desvio Padrão (DP) da articulação dos ratos nas 7 medidas realizadas.....	37
<b>Tabela 5</b> – Resultado das medidas de edema nos diferentes grupos analisados.....	38
<b>Tabela 6</b> – Resultado das medidas de rubor nos diferentes grupos analisados.....	40
<b>Tabela 7</b> – Resultado das medidas de calor nos diferentes grupos analisados.....	41
<b>Tabela 8</b> – Resultado das medidas de dor nos diferentes grupos analisados.....	42
<b>Tabela 9</b> – Resultado das medidas de rigidez nos diferentes grupos analisados.....	43
<b>Tabela 10</b> – Resultado dos parâmetros clínicos dos ratos participantes do estudo.....	46
<b>Tabela 11</b> – Sinais e sintomas da inflamação relacionadas com a proteína C reagente.....	49

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>AINEs</b>	Drogas Anti-inflamatórias Não Esteroidais
<b>AR</b>	Artrite Reumatoide
<b>BIOLAB</b>	Laboratório de Biomedicina
<b>CFA</b>	Adjuvante Completo de Freund
<b>CGs</b>	Glicocorticoides
<b>CHCM</b>	Concentrao de Hemoglobina Corpuscular Média
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal
<b>DMARD</b>	Drogas Antirreumticas Modificadoras do Curso da Doença
<b>EPI'S</b>	Equipamentos de Proteo Individual
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média
<b>NUPE</b>	Núcleo de Pesquisa Experimental
<b>OMS</b>	Organizao Mundial da Saúde
<b>PCR</b>	Proteína C Reagente
<b>PFA</b>	Proteínas de Fase Aguda
<b>UFCEG</b>	Universidade Federal de Campina Grande
<b>UNIFIP</b>	Centro Universitário de Patos
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular Mdio
<b>VG</b>	Volume Globular

## SUMRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1 Histórico da apicultura</b> .....	16
<b>2.2 A Apitoxina</b> .....	16
2.2.1 Conceito.....	16
2.2.2 Método de extração.....	17
2.2.3 Normatização de comercialização da apitoxina.....	17
2.2.4 Componentes da apitoxina.....	17
2.2.4.1 <i>Peptídeos</i> .....	18
2.2.4.2 <i>Hialuronidase</i> .....	18
2.2.4.3 <i>Fosfolipase</i> .....	18
2.2.4.4 <i>Melitina</i> .....	18
2.2.4.5 <i>Apamina</i> .....	18
2.2.5 Aplicabilidade terapêutica da apitoxina.....	19
2.2.6 Artrite reumatoide.....	20
2.2.6.1 <i>Conceito</i> .....	20
2.2.6.2 <i>Fisiopatogênese</i> .....	20
2.2.6.3 <i>Adjuvante Completo de Freund na indução de artrite</i> .....	21
2.2.6.4 <i>Diagnóstico</i> .....	23
2.2.6.5 <i>Tratamento</i> .....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1 Local do estudo</b> .....	25
<b>3.2 População e amostra</b> .....	25
3.2.1 Critérios de inclusão.....	26
3.2.2 Critérios de exclusão.....	26
<b>3.3 Instrumentos utilizados</b> .....	26
3.3.1 Avaliação.....	27
3.3.2 Fármacos.....	27
3.3.3 Tratamento.....	27
3.3.4 Instrumentos.....	27
3.3.5 Equipamentos.....	27
<b>3.4 Procedimentos</b> .....	27

<b>3.5 Análise de dados.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Aspectos éticos.....</b>	<b>33</b>
3.6.1 Riscos da pesquisa.....	33
3.6.2 Benefícios da pesquisa.....	33
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Amostra da linhagem Ratos <i>Wistar</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Peso.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Comprimento.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Temperatura.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Edema.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Rubor.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7 Calor.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Medidas de dor e rigidez.....</b>	<b>42</b>
<b>4.9 Parâmetros hematológicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.10 Amostra com concentração de Proteína C</b>	<b>48</b>
<b>Reativa.....</b>	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A apicultura possibilita um diferencial, inclusive sobre outras criações, pois nos fornece de forma sustentável alguns produtos como mel, geleia real, cera, e o próprio veneno produzido pelas abelhas do gênero *Apis mellifera* cujo objetivo é proteger a colônia contra predadores (SOUZA *et al.*, 2016).

De acordo com Dantas *et al.* (2013), outra importância do veneno de abelha, também denominado como apitoxina, é o seu potencial terapêutico no que se diz respeito às atividades: Neuroprotetor, radioprotetor, cicatrizante, antitumoral, anti-inflamatório e anti-nociceptivo/analgésico.

Para Leite e Rocha (2005), as possibilidades do uso terapêutico do veneno de abelha são inúmeras, entre elas podemos destacar as patologias reumatológicas como a bursite, tendinite e a artrite reumatoide, sendo a última com destaque no estudo.

Mangini e Melo (2003) definem a artrite reumatoide é uma doença articular autoimune de etiologia idiopática, caracterizada por inflamação sinovial e erosão óssea e, podendo haver, também, manifestações extra-articulares. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 25% da população acima de 65 anos sofram de dor e incapacidade devido algumas patologias inflamatórias e degenerativas (RICCI; COIMBRA, 2006).

Oliveira *et al.* (2015) e Hallert *et al.* (2004), mostram que a incapacidade de realizar as Atividades Básicas de Vida Diária, é habitualmente associada a uma maior dependência física e mental, diminuindo a capacidade de trabalho e o rendimento financeiro, e aumentando a utilização dos serviços de assistência à saúde.

Frente a essa problemática, surgiu um interesse pessoal nesta pesquisa que se acentuou a partir das vivências realizadas em uma Instituição de Ensino Superior do interior da Paraíba, com indivíduos que apresentam comprometimento da cartilagem articular, em especial de joelhos, considerando também à escassez literária sobre o tema proposto.

A artrite poderá vir acarretar vários tipos de complicações, entre elas a incapacidade funcional que pode muitas vezes gerar insegurança diante situações novas, comprometimento no desenvolvimento da percepção espacial e habilidades motoras. Em meio a essas complicações a intervenção terapêutica por meio da apitoxina tem como finalidade promover ao portador da artrite inúmeras reações fisiológicas que visam minimizar o agravamento da disfunção, garantindo uma melhor qualidade de vida, mas ainda, faz-se a necessidade que haja pesquisas voltadas à temática. Uma vez tendo essa associação, o estudo objetivou verificar as



ações anti-inflamatória e anti-nociceptivo, com uso da apitoxina de *Appis Mellifera* sobre a artrite de joelho induzidas em ratos *wistar*.

A partir do exposto o estudo teve como finalidade verificar as ações anti-inflamatória e antinociceptiva, com uso da apitoxina de *Apis mellifera* sobre a artrite de joelho induzidas em ratos *wistar*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico da apicultura

A apicultura é uma atividade agropecuária destinada a criação e manejo de abelhas da espécie *Apis mellifera* também conhecida como abelhas africanizadas, em confinamento sob supervisão e controle do homem, no qual são utilizados equipamentos e métodos para abrigá-las em colmeias artificiais, como também utilizados na sua sobrevivência e produção natural de matérias-primas (PERUCA *et al.*, 2002).

Em meados dos anos 70, novas raças de abelhas foram introduzidas no Brasil, destacando-se as abelhas africanizadas, com o passar dos tempos, a atividade apícola foi se profissionalizando e novas técnicas de produção foram surgindo devido as características climáticas do país, com diversidade e abundância de flora, além disso a apicultura muitas vezes se torna uma fonte de renda extra devido a facilidade na criação e por não necessitar de cuidados diários, permitindo ao agricultor alternar com outras atividades (GONÇALVES, 2004).

A atividade de criação de abelhas reúne todos os requisitos do tripé da sustentabilidade: Ecológico no qual gera baixo impacto ambiental, contribuí também com a conservação do meio ambiente da biodiversidade natural e vegetação local, que são fontes de alimentos como o pólen e néctar; Social a mão-de-obra é realizada pelo agricultor ou até mesmo o próprio familiar, evitando assim a evasão dos produtores para áreas urbanas; Econômico que é gerador de renda para os produtores, entre eles destaca-se o mel, geleia real, cera, polinização e a apitoxina (SOUZA, 2014).

### 2.2 A Apitoxina

#### 2.2.1 Conceito

A apitoxina é um produto secretado pelas abelhas da espécie *Apis Mellifera*, cujo objetivo é proteger a colônia contra predadores presentes próximos ou nas colmeias, esse veneno é secretado através de glândulas de secreção ácida e de secreção alcalina, encontrada no interior do abdômen das abelhas operárias (FITZGERALD; FLOOD, 2006; KAZIMÍROVÁ, 2012).

### 2.2.2 Método de extração

Para extrair a substância é utilizado um coletor feito de madeira ou plástico com armação de arame e abaixo da armação uma folha de vidro, podendo ser coberta com plástico ou material de borracha para evitar a contaminação do veneno, o coletor é conectado a um dispositivo que gera impulsos elétricos alimentado com bateria de 12v e 2ª. A coleta deve ser feita apenas 60 minutos por dia e para adquirir um grama de veneno é preciso extrair de uma quantidade equivalente a dez colmeias (ABRANTES, 2015).

Para o procedimento com uso do coletor, o mesmo é depositado dentro da colmeia, as abelhas entram em contato com o dispositivo e recebem um choque elétrico moderado, com isso elas picam a superfície da folha do coletor, pois compreendem a estímulo elétrico como uma fonte de perigo. O veneno é então depositado entre o vidro e o material protetor, após isso espera-se sua secagem e depois é retirado a substância e acondicionada em recipiente e temperatura apropriada (DANTAS, 2013).

### 2.2.3 Normatização de comercialização da apitoxina

Com base no art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria de Defesa Agropecuária, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, considerando que é necessário instituir medidas que normatizem a industrialização de produtos de origem animal, garantindo condições de igualdade entre os produtores e assegurando a transparência na produção, processamento e comercialização (BRASIL, 1999).

Foi aprovado pelo secretário de defesa agropecuária, substituto, do ministério da agricultura e do abastecimento e publicado no Diário Oficial da União no dia 23 de janeiro de 2001, o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de apitoxina, no qual se refere a apitoxina destinada ao comércio nacional ou internacional, e com objetivo de estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve atender a apitoxina, a ser utilizada como matéria-prima para fins opoterápicos (BRASIL, 2000).

### 2.2.4 Componentes da apitoxina

A terapia com veneno de abelhas, é utilizada na medicina tradicional chinesa, Grécia antiga e Egito, há séculos, para tratamento da artrite, reumatismo, outras doenças autoimunes,

também contra câncer, doenças da pele, infecção. Os Principais componentes da apitoxina são:

#### *2.2.4.1 Peptídeos*

Polipeptídeo de granulador de mastócitos tem como função expulsar os predadores como os artrópodes e insetos, em estudo feitos com ratos observou o aumento da memória a curto prazo (BECK, 1997).

#### *2.2.4.2 Hialuronidase*

Substância não muito toxica, libera o ácido hialurônico que conecta uma célula a outra (espaço extracelular), facilitando a entrada de substâncias curativas para e a eliminação de substâncias tóxicas em uma área danificada (BECK, 1997; SOUZA, 2008; FRANÇA; MEDEIROS, 2003).

#### *2.2.4.3 Fosfolipase*

A2 é uma enzima encontrada em todos os seres vivos, sendo uma das mais ativas fosfolipasas. Provoca ruptura dos fosfolipídios da membrana celular, contração do músculo liso, hipertensão e aumento da permeabilidade vascular (SOUZA 2008; MAIA, 2012). Na apitoxina existem duas substâncias de fosfolipase A2, sendo encontrado em maior quantidade nas abelhas africanas que nas europeias pequenas doses, a fosfolipase A2 não apresenta danos, exceto em pessoas alérgicas (MAIA, 2012).

#### *2.2.4.4 Melitina*

É uma proteína com ações de atividade hemolítica, antifúngica, antitumoral, poderoso efeito bactericida e alto poder anti-inflamatório, sendo considerada o principal agente da apitoxina na terapia da artrite reumática (FRANÇA; MEDEIROS, 2003).

#### *2.2.4.5 Apamina*

É um conjunto com outra substância a melitina, elas estimulam os sistemas adrenal e pituitário a produzirem cortisol e outros esteroides naturais, que tem relevante papel na terapia

da artrite (MAIA, 2012).

### 2.2.5 Aplicabilidade terapêutica da apitoxina

O médico austríaco Philip Terc. redescobriu a ação curativa da apitoxina com fins terapêuticos aplicados a seres humanos e animais. Por apresentar uma mistura de enzimas, peptídeos, aminas, carboidratos e lipídeos, será desencadeado reações biológicas e bioquímicas resultando em ações benéficas no tratamento de diversas patologias (ALMEIDA, 2017).

Para Moreira (2012) a apitoxina atua no tratamento de doenças do aparelho respiratório, neurológicas, dermatológicas, reumatológicas, entre outros. Devido as ações anti-inflamatória, analgésica, vasomotor e imunoativação, porém essas ações dependerão das frações e quantidades das enzimas presentes na toxina.

Ainda segundo o autor acima citado a função principal da apitoxina é de equilibrar e aumentar as defesas do organismo e suas indicações incluem doenças/disfunções dermatológicas, hematológicas, otorrinológicas, pulmonares, osteoarticulares, cardiológicas, imunológicas, neurológicas, degenerativas, endocrinológicas, geniturinárias, digestivas e autoimunes.

Como relação as doenças osteoarticulares e autoimune, no qual se enquadra a artrite reumatoide, baseado nas propriedades da apitoxina e suas ações, que se destaca o seu alto poder analgésico e anti-inflamatório, a terapia atua na alteração na resposta imune, e com relação a ação anti-inflamatória por estimulação da produção natural do cortisol (MORSOLETO *et al.*, 2005).

O tratamento por apiterapia em alguns tipos de artrite, como a artrite reumatoide, tem que ser complementar à fisioterapia, servindo como: “um apoio a reabilitação convencional, reconhecendo suas potencialidades e perigos, mas também sua efetividade analgésica, anti-inflamatória, de apoio a restauração do tecido articular e melhora na qualidade de vida dos pacientes (TOBAR; ANDRADE; GÓNGORA, 2010).

Como em toda terapia existe contraindicação, esta modalidade terapêutica também apresenta, como em pacientes que apresentam alergia a toxina, diabetes, hemofilia, insuficiência renal, gestantes, entre outras. Em caso de altas dosagens do veneno poderá ocorrer dano irreparável, como a morte, esses indivíduos apresentam necrose tubular aguda

com presença de cilindros de hemoglobina e/ou mioglobina no interior dos túbulos renais, os músculos esqueléticos apresentam proteólise intensa com liberação de mioglobina e creatinofosfoquinase para a circulação (MODANESI, 2012).

Apesar de toda sua eficácia, sendo um dos mais importantes produtos da apicultura na indústria farmacêutica, no Brasil o uso da apitoxina é pouco utilizada devido as reações alérgicas, porém em outros países a terapêutica é muito empregada (ALMEIDA, 2017).

## 2.2.6 Artrite reumatoide

### 2.2.6.1 Conceito

A Artrite Reumatoide (AR) é uma patologia autoimune, ainda de etiologia desconhecida, caracterizada com quadro álgico e inflamatório e por acometimento de várias articulações periférica, apresenta-se de forma simétrica que leva à deformidade e à destruição das articulações em decorrência da erosão óssea e da cartilagem (OKUA; PINHEIRO; ARAÚJO, 2009).

De acordo com alguns estudos o desenvolvimento da AR está ligada as doenças autoimunes devido os por fatores hormonais, ambientais e imunológicos, que atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis. Outro contribuinte são os fatores genéticos que estão associados à positividade do anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) e à resposta do paciente ao tratamento. Com relação ao sexo, a probabilidade é três vezes mais no sexo feminino com o desenvolvimento de formas mais graves da doença (LUNDSTRÖM, 2009).

### 2.2.6.2 Fisiopatogênese

Com relação a fisiopatogenia da artrite reumatoide, Goeldner *et al.*, (2011) relatam que: A AR é resultante da ação das células T e B autorreativas, que levam à sinovite, à infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea. A membrana sinovial é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases e, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promove a destruição articular. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o pannus, característico da AR.

A membrana sinovial, que normalmente secreta o fluido articular para lubrificação e nutrição da cartilagem, consiste em uma ou duas camadas de células formadas pelos sinoviócitos tipo A (semelhante ao macrófago) e tipo B (semelhante ao fibroblasto) e tecido conjuntivo frouxo adjacente. Os sinoviócitos do tipo A normalmente fagocitam os restos celulares e outros materiais (*debris*) presentes no fluido sinovial. Algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são também liberadas por essas células. Já os sinoviócitos tipo B, mediante um processo inflamatório articular, são capazes de produzir prostaglandinas (PGs) e enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMP) na articulação (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2005).

O desenvolvimento progressivo da artrite está acompanhante do reconhecimento de antígenos por linfócitos T CD4+ no tecido sinovial, a relação com agentes infecciosos, ou a exposição a outros agentes externos. Iniciado o processo inflamatório, ocorre a resposta nociceptiva e de edema na articulação. A partir da ativação das células T e B os monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais são estimulados aumentando a produção de moléculas pró-inflamatórias como as citocinas, quimiocinas, auto-anticorpos imunocomplexos e mediadores endógenos (CAMARGO, 2007).

Dando sequência, ocorre a estimulação na produção de metaloproteinases de matriz pelos fibroblastos, osteoclastos e condrócitos. Os auto-anticorpos reconhecem moléculas articulares como o colágeno tipo II e os proteoglicanos, promovendo assim a inflamação sinovial (CAMARGO, 2007).

A evolução do quadro leva à proliferação das células sinoviais, o edema, osteopenia periarticular e a formação do *pannus* invasivo associado ao quadro de erosão do tecido ósseo, degradação da cartilagem e neovascularização da cavidade sinovial (SZEKANECZ; KOCH, 2001).

A artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) é um modelo experimental de doença autoimune mediada por células T que se assemelha à artrite reumatoide do homem, e que causa mudanças histopatológicas, infiltração celular, hipersensibilidade e edema da articulação afetada. O experimento é utilizado para investigação de tratamentos sejam eles farmacológicos ou condutas com exercício adequados para a artrite reumatoide (ZHANG *et.al.*, 1999).

#### 2.2.6.3 Adjuvante Completo de Freund na indução de artrite

O CFA, em homenagem a Jules T. Freund, imunologista nascido na Hungria, é uma

solução que é utilizada para potencializar a resposta do sistema imunitário humoral e celular contra a uma substância estranha, ou seja, imunógenos coadministradores. É composto por uma emulsão oleosa em água com bactérias inativadas ou secas, geralmente de *Mycobacterium tuberculosis* ou espécies *Mycobacterium butyricum* (GOMES, 2008).

Podemos encontrar dois tipos de adjuvante de Freund sendo a primeira solução contendo óleo mineral adjuvante completo de Freund, que é um tipo de emulsão de água em óleo de parafina, contém também um surfactante chamado mono-oleato de manida e microbactérias mortas pelo calor. Já o segundo tipo é chamado de adjuvante incompleto de Freund não contém microbactérias e é menos eficaz (NAGAKURA *et al.*, 2003).

Por ser um agente muito potente, o Adjuvante completo de Freund estimula a imunidade mediada por células e humoral, isso quer dizer que anticorpos atacam as células do sistema imunológico. A solução de CFA é um agente tóxico, pois o óleo mineral não pode ser metabolizado de forma eficiente, resultando assim na formação de granulomas, necrose, inflamação, dor e em locais de aplicação. Quando ocorre exposição recorrentes a adjuvante completo pode levar a reações graves, diminuição da imunidade, até a morte (GOMES, 2008).

Para o manuseio de todos os materiais devem ser estéreis e locais de injeção devem passar pelo procedimento de antissepsia para evitar a contaminação e infecção. A via mais utilizada é a via subcutânea ou intraperitoneal, outros tipos de vias poderiam sofrer complicações como úlceras e necrose devido administração por via intradérmica, a necrose dos músculos e claudicação pode resultar da administração intramuscular, e embolia pulmonar podem resultar da administração intravenosa (NAGAKURA, *et al.*, 2003).

Ainda para Nagakura *et al.* (2003), outros meios de precauções é que o Adjuvante completo de Freund é uma substância perigosa e não está aprovado para testes em seres humanos, seu procedimento é utilizado em animais de laboratório. Para evitar qualquer acidente de contato com a pele, deve-se utilizar vestuário de proteção, bem como a área de manipulação, deve ser bem iluminado e bem ventilado.

É por meio do CFA que é induzida a doença autoimune, que se assemelha a artrite apresentada em humanos (ZHANG *et al.*, 1999). O método consiste na injeção intradérmica de CFA de *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum* em locais anatômicos específicos de ratos (BILLIAU; MATTHYS, 2001). Após a indução ocorre o processo inflamatório de forma rápida, geralmente em dez dias de forma agressiva, a inflamação acomete uma ou várias articulações e provoca intensa reabsorção óssea. A via de imunização é intradérmica, na base da cauda, nas articulações de joelho ou tornozelo, porém existe vários métodos de indução, conforme alguns autores abaixo (CANNON *et al.*, 1993).



Na pesquisa de Menezes (2013) foi realizado indução com injeção intradérmica de 0,1 mL de CFA na base da cauda, lateral esquerda, logo foi feita a injeção intraplantar de 0,1 mL de CFA na pata posterior direita. Após cada injeção, foi aguardado aproximadamente 10 s antes da retirada da agulha, a fim de evitar o efluxo do líquido injetado. No dia seguinte, foi realizado o procedimento da segunda injeção intradérmica de 0,1 mL de CFA na base da cauda, lateral direita.

No estudo de Gomes *et al.* (2014) os ratos da linhagem *Wistar* receberam duas injeções de adjuvante completo de Freund com *Mycobacterium tuberculosis* (1,0mg/mL; 50µL) e *Mycobacterium butiricum* (0,5mg/mL; 50µL) intra-articular nas articulações tibiotársica ou tibiofemural ou, ainda, uma injeção de adjuvante completo de Freund (*Mycobacterium butiricum* ou *tuberculosis*) intradérmica na base da cauda e outra intra-articular (tibiotársica ou tibiofemural). Para os diversos protocolos de indução neste estudo, foram utilizados intervalos de 8 dias quando feito com *Mycobacterium tuberculosis* e 21 dias *Mycobacterium butiricum*.

Após a imunização, ocorre a destruição articular, infiltrado celular, particularmente o neutrofílico, porém essa resposta inflamatória dependente da ativação das células T. O quadro apresenta sinais semelhantes com a artrite humana como edema das extremidades, degeneração das cartilagens, infiltração de linfócitos, perda funcional das articulações e reabsorção óssea (MENEZES, 2013)

#### 2.2.6.4 Diagnóstico

Segundo Goeldner *et al.* (2011), o diagnóstico da Artrite Reumatoide é realizado através da avaliação clínica através de tópicos da inspeção, palpação, exames laboratoriais, cujo objetivo é sinais de comprometimento funcional e detectar inflamação, já os de imagem para diagnosticar a presença de processo degenerativo e inflamatório.

No que se diz respeito ao diagnóstico após indução, durante a avaliação, mais precisamente no exame físico podemos observar, o edema periarticular no local da aplicação (joelho ou tornozelo), pelo volume de pata ou espessura da articulação, presença de eritema e deformidade. No que tange os exames laboratoriais é utilizado hemograma e Proteína C Reagente (PCR) para avaliar reações inflamatórias, e leucograma do fluido sinovial para mensurar o quantitativo de leucócitos. Os exames laboratoriais sevem para garantir metodologia científica e permite validação nos resultados do estudo. No exame de imagem como ultrassonografia, ressonância nuclear magnética ou radiografia pode-se observar

destruição da membrana sinovial, destruição progressiva das matrizes extracelulares dos tecidos ósseo e cartilaginoso e a redução do espaço articular do joelho doente (TRENTHAN; TOWNES; KANG, 1977).

#### 2.2.6.5 Tratamento

Estudos comprovam a importância do tratamento precoce e adequado da AR, entre eles a educação do paciente, terapias psico-ocupacionais e medicamentos que inclui drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (CGs), drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença (DMARD) e agentes imunobiológicos (DANTAS *et al.*, 2013).

Ainda segundo o autor acima, por se tratar de uma doença autoimune e inflamatória, a Apitoxinoterapia tem sido estudada como alternativa para tratamento da artrite reumatoide por possuir um efeito supressor sobre respostas pró-inflamatória. A apitoxina exerce um efeito anti-inflamatório por suprimir a transcrição gênica da cicloxigenase e citocinas pró-inflamatórias

Com base na fisioterapia, ela atua para restaurar o grau de funcionalidade através de condutas utilizando a cinesioterapia aplicadas em solo ou meio aquático, visando a redução do quadro algico, melhora dos sinais e sintomas da inflamação, fortalecimento e alongamento da musculatura (TOBAR, ANDRADE, GONGORA, 2010).

Para alguns autores, a exemplo de Laurindo *et. al.* (2002) na fase aguda, o tratamento é apenas com medidas de analgesia e, após a diminuição dos sintomas de dor e edema, nas fases subaguda e crônica, inicia-com exercícios para mobilidade articular, flexibilidade e força. A conduta precoce com movimento pode agravar a dor e aumentar o edema. Já para Rall e Roubenoff (2000) recomendam que durante a fase ativa da doença, ocorra a realização de exercícios físico sem carga e que quando houver redução da doença, incluir pesos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

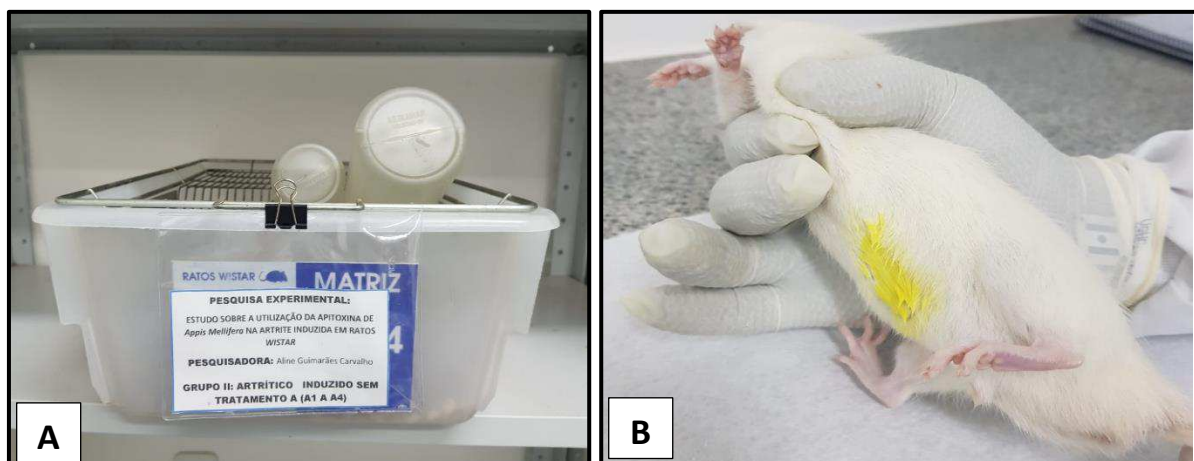
#### 3.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Centro de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Campina Grande, campus Pombal– PB, em parcerias com os Laboratórios de Pesquisa Experimental do Centro Universitário de Patos - UNIFIP e com o laboratório de Biomedicina BIOLAB - UNIFIP. No que se diz respeito a matéria-prima, a apitoxina, foi adquirida em um apiário localizado no Rio Grande do Norte, e o fármaco foi formulado em um laboratório localizado na cidade de Sousa-PB, utilizando 4g de apitoxina, resultando em uma emulsão não iônica de apitoxina a 0,7%.

#### 3.2 População e amostra

Para esta pesquisa, foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos e fêmeas, oriundos do biotério do Núcleo de Pesquisa Experimental – NUPE da UNIFIP, onde foram dispostos em 5 grupos, com 10 ratos em cada. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno, contendo entre 3 a 4 ratos do mesmo sexo em cada, previamente identificados com ácido pícrico em cada parte do corpo (Figura 1), os mesmos foram mantidos em uma sala com temperatura ambiente entre 22°C a 24°C, também eram submetidos a um ciclo de claro/escuro de 12h, alimentados com ração específica ad libitum e com água a livre demanda através de bebedouros instalados na gaiola, estes tiveram distribuídos:

**Figura 1** – População e amostra em: (A) gaiolas de polipropileno, com separação de grupos; (B) identificação da amostra com ácido pícrico.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

GRUPO I-

✓ Variável de Controle (C1 a C10) - sem indução e tratamento (sendo 7 fêmeas e 3 machos);

GRUPO II-

✓ Artrítico induzido A (A1 a A10) - artrítico induzido sem tratamento posterior (sendo 6 fêmeas e 4 machos);

GRUPO III-

✓ Artrítico induzido X (X1 a X10) - Com tratamento através de exercício físico (sendo 6 fêmeas e 4 machos);

GRUPO IV-

✓ Artrítico induzido Y (Y1 a Y10) - Com tratamento utilizando Apitoxina (sendo 7 fêmeas e 3 machos);

GRUPO V-

✓ Artrítico induzido Z (Z1 a Z10) - Com tratamento utilizando Apitoxina e exercício físico (sendo 7 fêmeas e 3 machos).

### 3.2.1 Critérios de inclusão

Animais machos e fêmeas de três meses, nunca manuseados, com condição geral ao estado clínico e motricidade normal e que apresentaram artrite por meio de indução.

### 3.2.2 Critérios de exclusão

Animais machos e fêmeas com alterações de comportamento com agressividade, Autofagia ou mutilação entre os animais e outras patologias que afetam a funcionalidade que

não esteja relacionada a indução.

### **3.3 Instrumentos utilizados**

Anotações diárias de tratamento e avaliação semanal, no que se diz respeito morfometria de peso e medida corporal, temperatura, medida da articulação, quadro inflamatório, dor e funcionalidade utilizando instrumentos como:

#### **3.3.1 Avaliação**

Foram utilizados como instrumentos para avaliação: coletor de Paquímetro, balança de precisão, fita métrica, termômetro infravermelho.

#### **3.3.2 Fármacos**

Os fármacos utilizados foram: Anestésico ketamina® a 10% na dose de 1 g/kg (0,1 mL/100 g) e xilazina® a 2% na dose de 0,02 g/kg (0,1 mL/100 g), apitoxina em emulsão creme a 0,7%, seringas de 2ml.

#### **3.3.3 Tratamento**

Foram utilizados tanques com capacidade para 20l de água com as seguintes dimensões: 70cm X 55cm X 40cm (profundidade, largura e comprimento, respectivamente e nível da água de 40 cm, toalhas, aquecedor de água, espátulas.

#### **3.3.4 Instrumentos**

Foram utilizados para eutanásia e coleta de sangue: caixa de inox 18x08x03 cm, pinça anatômica com dente de rato 16 cm, pinça anatômica com serrilha 16 cm, tesoura cirúrgica 15 cm, bandejas de dissecação.

#### **3.3.5 Equipamentos**

Compreende os de uso contínuo, como: luva de aço, gaiolas de polipropileno e Equipamentos de Proteção Individual- EPI'S como luva de látex, máscara e touca.

### 3.4 Procedimentos

A obtenção dos dados aconteceu após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do uso animal. A manipulação foi feita com intervalo de 24 (vinte e quatro) horas, e de preferência no mesmo horário.

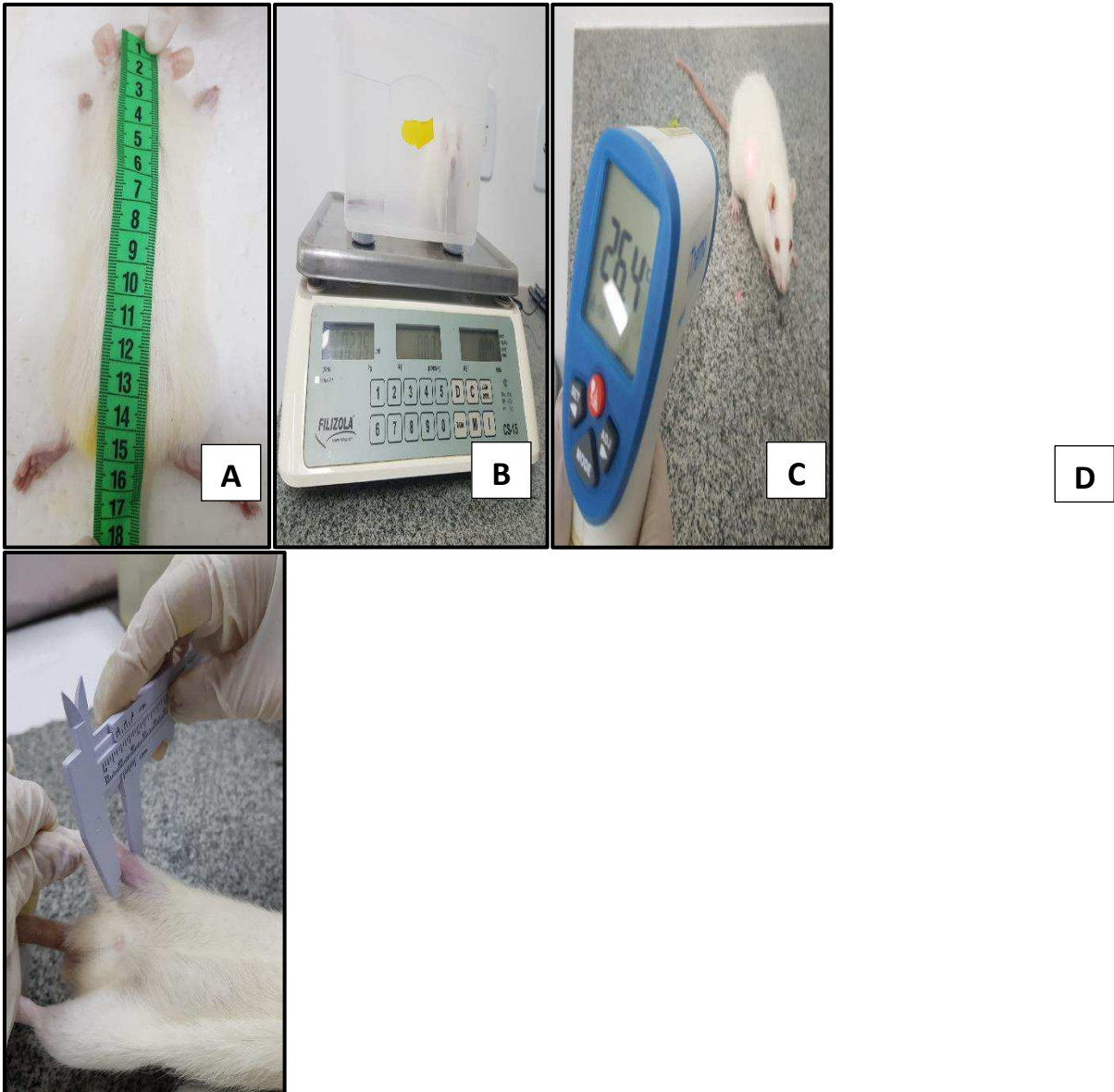
O tratamento foi realizado 5 (cinco) vezes por semana. Cada procedimento foi efetuado por um pesquisador treinado, único, o qual obedeceu a uma sequência idêntica das normas já estabelecidas.

Para obtenção da matéria-prima foi realizado a escolha de um apiário localizado na cidade de Natal- Rio Grande do Norte, no qual ela é coletada através de uma instalação de colmeias que contém placas coletoras e eletroestimulador, onde por meio de choques elétricos com utilização de eletrodos de aço inox conectados a uma bateria e lâminas de vidro posicionado no alvado da colmeia, retêm a apitoxina após a picada de abelha.

As lâminas contendo o produto é deitada sobre uma mesa em ambiente desumidificado, onde após 3h, com uma lamina de estilete é retirado a apitoxina através de raspagem e armazenado em frasco âmbar, lacrado, embalado em plástico PVC e transportado em uma caixa de isopor até o destino na cidade de Patos – PB.

Antes do início dos protocolos, os animais foram anestesiados com ketamina® a 10% na dose de 1 g/kg (0,1 mL/100 g) e xilazina® a 2% na dose de 0,02 g/kg (0,1 mL/100 g), em seguida mensurados: O comprimento com utilização de uma fita métrica no sentido céfalo-caudal, peso através de uma balança, temperatura corporal com o termômetro infravermelho, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral com um paquímetro posicionado na região da interlinha articular do joelho, utilizada como ponto de referência no sentido latero-medial (Figura 2), os sinais de dor no qual foi observado a presença de claudicação durante a deambulação por tempo de 5 minutos, rubor com alteração da coloração, a cor vermelha com todas as suas nuances.

**Figura 2** – Avaliação da amostra: (A) comprimento; (B) peso; (C) temperatura; (D) medição da articulação do joelho.



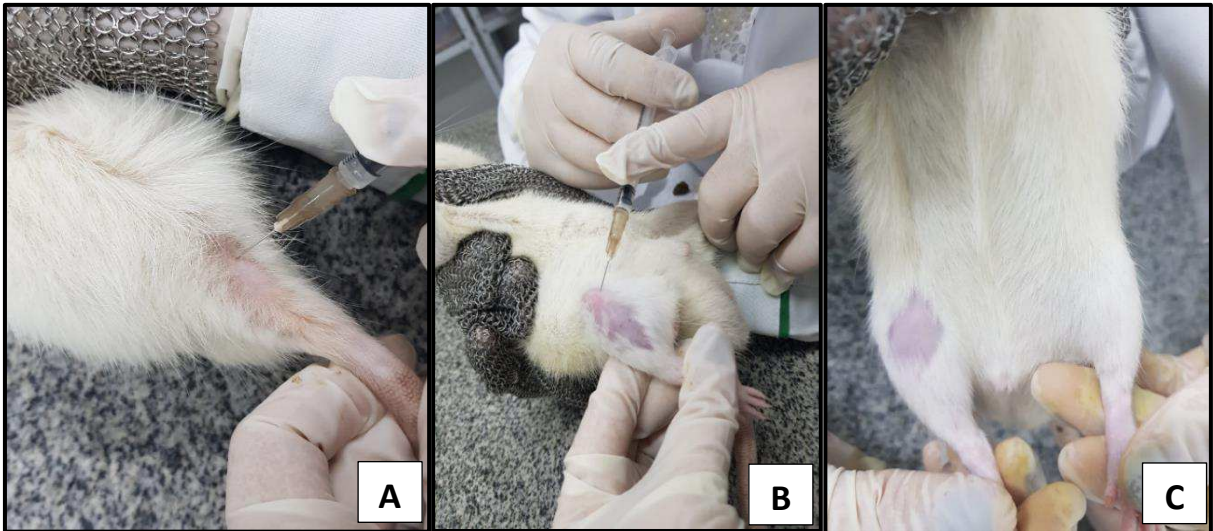
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2019.

Ainda na avaliação, observou o calor com aumento da temperatura da região em comparação com o contralateral no qual foi realizado a avaliação comparativa através do toque, rigidez intra-articular por meio de mobilização manual da articulação em comparação com a articulação contralateral, determinando, desta forma, a resistência à flexão ou extensão, de acordo com Evans *et al.* (1960).

Logo após, iniciou-se o processo de indução da artrite seguindo o protocolo de Gomes (2008) através do Adjuvante Completo de Freund – CFA contendo *Mycobacterium butyricum* (0,5mg/mL; 50 $\mu$ L) na base da cauda (intradérmica) e outra na articulação Tibiofemoral (intra-articular, 50  $\mu$ L), após 21 dias (Figura 3).

**Figura 3** – Indução da artrite: (A) base da cauda; (B) articulação tibiofemoral; (C) articulação após a finalização do protocolo de indução.



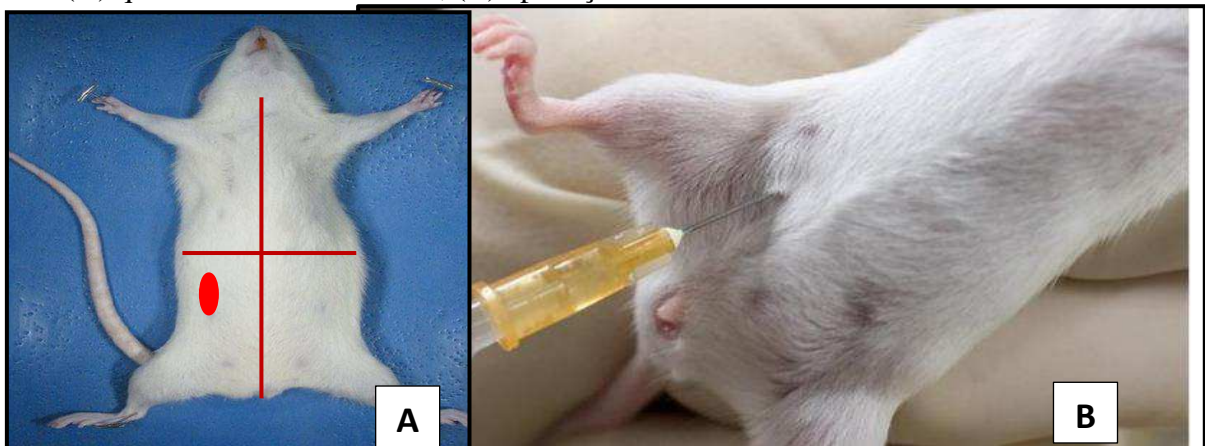


Fonte: dados da pesquisa, 2019.

Na coleta final, foi realizada uma nova avaliação do comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral, os sinais de dor, rubor, calor, rigidez e a coleta de sangue para análise da Proteína C Reativa (PCR) e hemograma completo.

Ao final seguiu o protocolo de eutanásia de acordo com a Resolução Normativa N° 13, de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013) com administração, por via intraperitoneal de sobredosagem de ketamina® a 10% na dose e xilazina® a 2%, após confirmação da morte através da perda de consciência, ausência de reflexos e apneia (Figura 4).

**Figura 4** – Administração, por via intraperitoneal da ketamina® a 10% na dose e xilazina® a 2%: (A) quadrante inferior direito; (B) aplicação dos anestésicos.

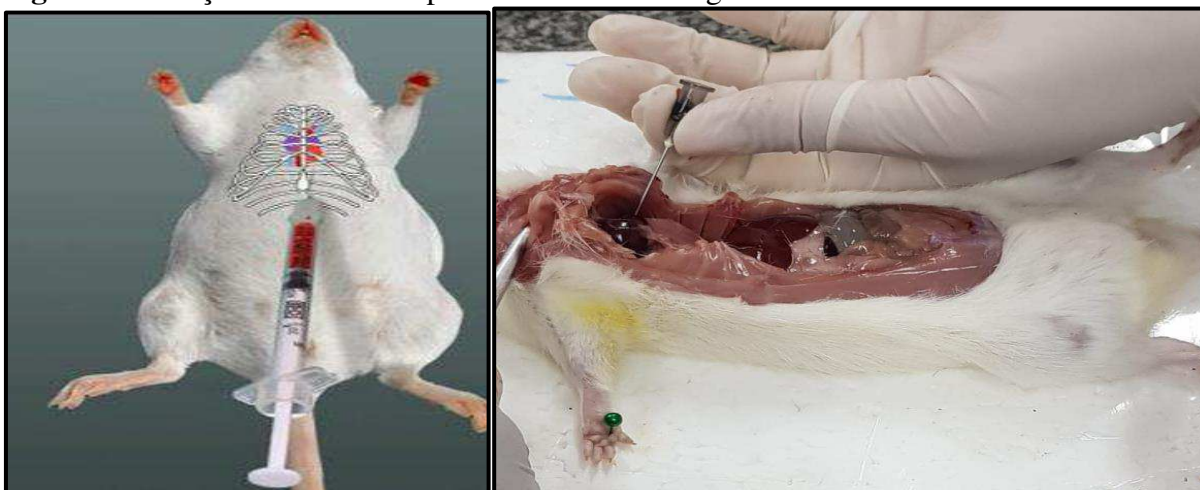




**Fonte:** <https://www.unifal-mg.edu.br/ABELA-DE-DOSES-para-CEUA>.

Dando sequência foi realizada a coleta de sangue por meio de punção cardíaca direta (Figura 5), e logo o sangue foi colocado em tubo coletor de 2 ml com EDTA e encaminhado para o laboratório para análise. Para rejeite, a carcaça foi acondicionada em saco branco de resíduo biológico, seguindo o descarte de resíduos.

**Figura 5** – Punção intracardíaca para análise hematológica



**Fonte:** CONCEA (2008); Dados da pesquisa, 2019.

O ciclo foi de aproximadamente dois meses para os grupos de estudo. Diante disso, os protocolos seguiram da seguinte forma:

#### GRUPO I

- ✓ Variável de Controle – Sem intervenção, apenas para comparação de resultados

#### GRUPO II

- ✓ Artrítico induzido A (artrítico induzido sem tratamento posterior) onde no primeiro dia passaram por avaliação inicial pré-lesão de comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral, sinais de dor, rubor, calor, rigidez e o procedimento artrite experimental com CFA na cauda, e que se repetiu 21º dia de aplicação na articulação, logo após foi realizado uma nova avaliação. Esta variável não realizou exercícios e nem experimento opoterápicos, com exceção do 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dia após a última aplicação do CFA, nos quais foram avaliados quanto à incapacitação articular, dor, rubor calor e rigidez, bem como comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação

da medida da articulação tíbio-femoral. Após o término dos procedimentos, foi feita uma nova coleta do exame físico e laboratorial para observar os resultados obtidos na pesquisa.

### GRUPO III

✓ Artrítico induzido X (Com tratamento através de exercício variável), no qual no primeiro dia passaram por avaliação inicial pré-lesão de comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral, sinais de dor, rubor, calor, rigidez e o procedimento artrite experimental com CFA na cauda, e que se repetiu 21º dia de aplicação na articulação, logo após foi realizada uma nova avaliação. Esta amostra realizou exercício variável no qual os animais realizaram o exercício de nadar com aumento gradativo de 30 segundos no intervalo de 24h, perfazendo no vigésimo dia dez minutos. Nesta amostra não foi realizado o experimento opoterápicos. No 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dia de treino, nos quais foram avaliados quanto à incapacitação articular, dor, rubor calor e rigidez, bem como comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral. Após o término dos procedimentos, foi feita uma nova coleta do exame físico e laboratorial para observar os resultados obtidos na pesquisa.

### GRUPO IV

✓ Artrítico induzido Y (Com tratamento utilizando Apitoxina), no primeiro dia passaram por avaliação inicial pré-lesão de comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral, sinais de dor, rubor, calor, rigidez e o procedimento artrite experimental com CFA na cauda, e que se repetiu no 21º dia de aplicação na articulação, logo após foi realizada uma nova avaliação. Esta variante realizou apenas o experimento opoterápicos diário na região articular do joelho acometido. No 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dia de experimentação, foram avaliados quanto à incapacitação articular, dor, rubor calor e rigidez, bem como comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral. Após o término dos procedimentos, foi feita uma nova coleta do exame físico e laboratorial para observar os resultados obtidos na pesquisa.

### GRUPO V

✓ Artrítico induzido Z (Com tratamento utilizando Apitoxina e exercício variável) no qual no primeiro dia passaram por avaliação inicial pré-lesão de comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral, sinais de dor, rubor, calor, rigidez e o procedimento artrite experimental com CFA na cauda, e que se repetiu no 21º dia de aplicação na articulação, logo após foi realizado uma nova avaliação. Esta amostra realizou exercícios variável no qual os animais realizaram o exercício de nadar com aumento gradativo de 30 segundos no intervalo de 12h, perfazendo no vigésimo dia dez minutos, associada ao experimento opoterápicos diário na região articular do joelho acometido. No 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dia de experimentação, foram avaliados quanto à incapacitação articular, dor, rubor calor e rigidez, bem como comprimento, peso corporal, temperatura corporal, avaliação da medida da articulação tíbio-femoral. Após o término dos procedimentos, foi feito uma nova coletado do exame físico e laboratorial para observar os resultados obtidos na pesquisa.

### **3.5 Análise de dados**

Para a análise dos dados foi empregado um estudo de natureza quantitativa do tipo estatístico através de tabelas e gráficos.

Os dados obtidos na avaliação foram cotados utilizando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 21). Foram realizadas as medidas de tendência central (Média) e medidas de dispersão (desvio de padrão), assim como medidas de frequências absolutas e relativas.

Para a análise inferencial foram utilizados os testes Qui-quadrado para verificar a relação direta entre as variáveis referentes as inflamações com o Proteína C Reagente (PCR), e o teste *T* para amostras pareadas, comparando assim os resultados antes e após a intervenção, em ambos os testes foi levado em consideração um *p* valor <0,05.

### **3.6 Aspectos éticos**

Esta pesquisa foi encaminhada para o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), regido de acordo com a Resolução nº 11/794, do dia 8 de outubro de 2008 que regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

Assegurando a segurança, bem-estar e ausência de dor ao animal que esteja sendo manipulado (CONCEA, 2008) e aprovado, seguindo o protocolo CEP/CEUA n°02/2019.

### 3.6.1 Riscos da pesquisa

Esta pesquisa apresentou risco mínimo para pesquisador, sendo possível controlar através do uso Equipamentos de Proteção Individual (EPI'S). Com relação à amostra poderá incidir possíveis ocorrências tais como estresse durante o período intervenção.

### 3.6.2 Benefícios da pesquisa

Esta pesquisa tem grandes proficuidades tais como, elucidar e orientar a comunidade acadêmica e a população sobre a ação e/ou benefícios da apitoxina no tratamento da artrite.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Amostra da linhagem Ratos *Wistar***

Participaram do estudo 50 ratos, porém com intercorrência na função motora (marcha lateral) em dois ratos do G5 durante as intervenções, no qual foram detectadas as alterações na avaliação inicial (antes da indução) e eliminados da pesquisa na avaliação final. Estes foram divididos em 5 grupos, G1= 10, sendo 07 (70,0%) do sexo feminino e 03 (30,0%) masculino. G2= 10, sendo 06 (60,0%) do sexo feminino e 04 (40,0%) do sexo masculino.

G3= 10, sendo 07 (70,0%) do sexo feminino e 03 (30,0%) do sexo masculino. G4= 10, sendo 07 (70,0%) do sexo feminino e 03 (30,0%) do sexo masculino e G5= 08, sendo 06 (60,0%) do sexo feminino e 02 (20,0%) do sexo masculino.

Com relação a intervenção ocorrida, o coeficiente de consanguinidade entre os animais de laboratório, leva o maior risco de anomalias recessivas, já que é comum em biotérios o acasalamento entre irmãos, o que é possível considerar um grande fator para tal ocorrência (BEIGUELMAN, 2003; NEVES, MANCINI FILHO, MENEZES, 2013).

## 4.2 Peso

Na tabela 1, a seguir, pode-se perceber que houve um aumento na média de peso em todos os grupos no decorrer das avaliações.

Nota-se que o peso tem uma variância entre grupos, sendo a menor média identificada no Grupo 5 com  $175,63 \pm 24,84$  na primeira avaliação e atingindo  $221,25 \pm 39,25$ , e a maior média encontrada no Grupo 3,  $241,50 \pm 54,62$ .

**Tabela 1** – Média e Desvio Padrão (DP) do peso dos ratos nas 6 medidas realizadas.

Variável	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP
Av. Peso I	209,00±30,71	175,00±33,74	185,50±44,74	187,50±41,58	175,63±24,84
Av. Peso II	227,50±32,93	203,50±48,30	231,50±49,10	210,50±51,23	202,50±33,91
Av. Peso III	228,50±33,00	208,50±46,31	232,00±51,00	212,50±53,03	201,25±34,71
Av. Peso IV	230,50±34,91	214,00±47,30	236,50±51,26	217,00±59,21	211,25±39,88
Av. Peso V	239,50±35,78	223,50±51,21	241,50±54,62	226,50±62,85	220,00±41,14
Av. Peso VI	239,50±37,74	226,50±51,91	240,50±53,30	232,00±63,86	221,25±39,25

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Conforme observado na tabela 1, houve uma variação de peso entre os grupos, essa diferença é decorrente dos arquétipos biológicos com destaque ao gênero, sendo o masculino com peso maior em relação ao feminino nessas raças de ratos, outra forma de variação no peso é a influência nutricional que está ligada diretamente a forma de alimentação dos animais, no qual essa média foi entre  $175,63 \pm 24,84$  a  $241,50 \pm 54,62$ .

De acordo com Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, o peso corporal médio do rato adulto em 10 semanas é para Macho: 400 g; Fêmea: 250 g (NEVES; MANCINI FILHO; MENEZES, 2013).

Já no estudo de Melo *et. al.* (2012) realizado no Biotério Central da Universidade

Federal de Sergipe, no qual foram utilizados 65 animais, da linhagem *Wistar*, com idade entre dois e três meses de ambos os gêneros, adultos, normais e saudáveis, pesavam entre 140-310 g., portanto, nota-se que esse peso pode variar de acordo com o biotério devido os padrões biológicos e ambientais dos animais.

A Pesagem do rato que é de suma importância para o cálculo da dose do anestésico a ser aplicada, bem como para acompanhar a uniformidade nos pesos dos animais utilizados no experimento (FERREIRA; OLIVEIRA; BARROS FILHO, 2005)

### 4.3 Comprimento

Na tabela 2, a seguir, pode-se perceber que houve um aumento na média de comprimento em todos os grupos no decorrer das avaliações.

Pode-se destacar que o grupo 3 foi o que obteve maior comprimento com média de  $22,70 \pm 1,33$  e o grupo 2 com menor média  $21,40 \pm 0,69$ , ambos com resultados no final da intervenção. O estado nutricional contribui para o crescimento dos animais, este deve conter em sua dieta micronutrientes como aminoácidos, vitaminas e sais minerais.

**Tabela 2** – Média e Desvio Padrão (DP) do comprimento dos ratos nas 6 medidas realizadas.

Variável	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP
<b>Av. Comprimento I</b>	21,39±3,17	19,20±0,63	20,00±0,94	20,70±1,05	19,50±0,92
<b>Av. Comprimento II</b>	21,60±1,07	20,50±0,97	21,20±1,13	21,00±1,33	20,88±1,12
<b>Av. Comprimento III</b>	22,00±1,05	21,30±0,82	21,90±1,28	21,60±1,35	21,13±1,45
<b>Av. Comprimento IV</b>	22,20±0,91	21,30±0,82	22,40±1,07	22,20±1,31	21,88±1,35
<b>Av. Comprimento V</b>	22,20±0,91	21,40±0,69	22,50±1,17	22,30±1,25	22,00±1,19
<b>Av. Comprimento VI</b>	22,30±0,82	21,40±0,69	22,70±1,33	22,40±1,43	22,00±1,19

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

De acordo com Ferreira, Oliveira e Barros Filho (2005), o comprimento é realizado no sentido crânio-caudal do animal, é medido entre a região occipital e a base do início da cauda. Este dado servirá para comparar as latências observadas nos diferentes ratos. Animais acima de 500g apresentam referência de comprimento de 17,80cm, porém como descrito anteriormente os dados morfométricos variam de acordo com a população de animais para cada biotério (NEVES; JORGE FILHO; MENEZES, 2013).

### 4.4 Temperatura

Na tabela 3 a seguir, é possível perceber que houve uma diminuição na média de temperatura em todos os grupos no decorrer das avaliações maior média na temperatura de  $29,66 \pm 0,94$  e menor de  $26,72 \pm 1,09$ .

**Tabela 3** – Média e Desvio Padrão (DP) da temperatura dos ratos nas 6 medidas realizadas.

Variável	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP	Media/DP
Av. Temperatura I	29,57±1,59	29,26±1,47	28,22±1,16	29,48±0,93	28,44±0,78
Av. Temperatura II	27,62±0,88	27,75±1,14	27,15±1,12	27,70±0,56	27,69±0,50
Av. Temperatura III	28,45±0,29	28,29±0,36	27,65±1,07	28,16±0,33	27,84±1,48
Av. Temperatura IV	27,81±0,84	27,23±0,73	26,96±0,62	26,72±1,09	27,06±1,16
Av. Temperatura V	29,17±0,65	29,66±0,94	26,79±1,45	28,61±1,07	27,20±2,23
Av. Temperatura VI	27,07±1,23	26,95±1,08	26,34±0,90	26,96±0,98	27,24±0,94

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Com base na temperatura, Ratos e camundongos são homeotérmicos, ou seja, controlam a temperatura corporal, independentemente da variação térmica do ambiente, variando sua taxa metabólica.

Os ratos não têm glândulas sudoríparas, quando ocorre variações de temperatura e umidade o animal pode apresentar estresse, queda de resistência e maior sensibilidade a infecções, acarretando problemas respiratórios quando mantidos em alta umidade e/ou baixas temperaturas. A cauda tem papel na termorregulação, na qual a vasodilatação difundi o calor e a vasoconstrição (NEVES, MANCINE FILHO; MENEZES, 2013).

Em uma pesquisa realizada por Morais (2014) os ratos foram aclimados por sete dias e abrigados em condições controladas de umidade (45-65%), luz artificial em ciclos de 12 horas claro/escuro, em um ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Já no estudo de Yamada *et. al.* (2019) observou-se que, a temperatura corporal apresenta variações de acordo com a área avaliada, a exemplo do escroto, focinho, perianal e globo ocular, com uma temperatura de  $24^\circ$  atingindo até  $33^\circ$ , o que corrobora com a pesquisa no qual encontramos temperaturas entre  $27^\circ$  a  $29^\circ$

#### 4.5 Edema

As próximas descrições estão relacionadas as tabelas 4 e 5 ligadas diretamente com edema. Na tabela 4, pode-se perceber que houve um aumento na média da medida da articulação em todos os grupos no decorrer das primeiras avaliações, destacando o grupo I referente ao controle, no qual não passou por nenhuma intervenção, com aumento de





Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Edema V</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Edema VI</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Edema VII</b>										
Presença	0	0	10	100	07	70	07	70	07	87,5
Ausência	10	100	0	0	03	30	03	30	01	12,5

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2020.

Em um estudo realizado Martignano *et. al.* (2013) com avaliação do ultrassom sobre a hiperalgesia e o edema em joelhos de rato *Wistar*, foi possível quantificar o edema na região da lesão experimental, utilizado paquímetro metálico, que foi posicionado na região da interlinha articular do joelho no sentido látero-medial. As coletas de dados foram realizadas sempre pelo mesmo avaliador, para esta avaliação utilizou-se o lado esquerdo como referência, visto que no mesmo não foi realizada nenhuma intervenção. Na presente pesquisa a mensuração foi realizada no mesmo sentido do estudo acima, com o instrumento paquímetro e seguindo mensuração com um único avaliador, porém houve comparativo do tamanho da articulação com as dos animais do grupo controle.

De acordo com a pesquisa, nota-se que após a indução, ou seja, na terceira avaliação, houve um aumento considerado no tamanho das articulações nos grupos II, III, IV e V, resultando no edema articular, confirmando assim a lesão. O aparecimento do edema faz parte do processo de inflamação que ocorreu após a indução com o CFA. Em um estudo realizado por Gomes *et. al.* (2014) no qual padronizou um modelo experimental de monoartrite crônica induzida por CFA *Mycobacterium butyricum*, verificou-se que a partir da segunda estimulação promoveu aumento do tempo de elevação da pata (nocicepção) e do edema.

Dado início a intervenção com apitoxina, exercício, ou associação das terapias, ocorreu uma redução gradativa do edema, com destaque para o grupo IV no qual apresentou uma melhora significativa na medida da articulação  $1,07 \pm 0,14$ . Essa redução do edema está associada ao efeito da apitoxina que contém algumas substâncias, a exemplo da melitina junta com a apamina, que vão estimular a produção de cortisol e outros esteroides naturais levando a ação anti-inflamatória (MOREIRA, 2012).

Já no grupo V, onde houve associações de terapias como a apitoxina e exercício, como já citado sobre a ação antiinflamatória da apitoxina, o exercício variável apresenta efetividade em diminuir os parâmetros inflamatórios, bem como em reduzir a migração total de



<b>Rubor IV</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Rubor V</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Rubor VI</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Rubor VII</b>										
Presença	0	0	08	80	01	10	01	10	0	0
Ausência	10	100	02	20	09	90	09	90	08	100

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Sabe-se que na artrite ocorre a inflamação, essa reação é uma resposta do tecido vascularizado a estímulos lesivos sejam eles físicos, químicos ou mecânicos, cuja finalidade é de eliminar o agente agressor e restaurar o tecido à sua forma e função normais (LIANZA, 2004).

Essa resposta envolve fenômenos de ordem vascular, tecidual e linfática, no qual manifesta-se de maneira estereotipada, de modo que os sinais clínicos de inflamação são: rubor, calor, tumor, dor e perda da função (MORAIS, 2014). Durante a pesquisa, o rubor que é representado pela hiperemia ou vermelhidão da área em virtude da dilatação dos vasos sanguíneos, mostrou-se presente desde a fase de indução, porém com uma redução da quantidade (ausência) na última avaliação nos grupos III, IV e V, grupos estes, que utilizaram terapias como o exercício, apitoxina e associação das condutas tendo assim eficácia na melhora do sinal característico da inflamação (GOMES *et. al.*, 2014; MOREIRA, 2012).

#### 4.7 Calor

Dando continuidade ao t pareado verificou-se o antes e o depois, utilizando a comparação da medida VI com a medida VII no variável calor, também se observou diferença significativa  $p < 0,05$  nos grupos III, IV e V, porém ao analisar as frequências relativas e absolutas percebe-se que o grupo III obteve melhores resultados nesse aspecto de calor. A vasodilatação promovida pela inflamação no qual resulta no aumento da temperatura local observada como variável no estudo, apresentou redução nos grupos com uso de apitoxina e exercícios devido a indução, a produção e a liberação do cortisol, que é um potente anti-inflamatório endógeno.

**Tabela 7** – Resultado das medidas de calor nos diferentes grupos analisados.

Variável	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
----------	---------	----------	-----------	----------	---------

	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<b>Calor I</b>										
Presença	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ausência	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
<b>Calor II</b>										
Presença	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ausência	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
<b>Calor III</b>										
Presença	0	0	10	100	09	90	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	01	10	0	0	0	0
<b>Calor IV</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Calor V</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Calor VI</b>										
Presença	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Ausência	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Calor VII</b>										
Presença	0	0	10	100	0	0	01	10	01	12,5
Ausência	10	100	0	0	10	100	09	90	07	87,5

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Como já mencionado anteriormente por Moraes (2014), o calor faz parte do processo inflamatório. Nota-se que seu aparecimento (presença) na quarta avaliação, ou seja, após a indução o que implica a confirmação da inflamação. Após início da conduta foi observado a ausência de calor em todos do grupo III na avaliação VII. Para os grupos IV e V apenas uma amostra de cada grupo persistiu com o sinal.

Ainda de acordo com o autor acima citado, calor é uma resposta vascular, a vasodilatação garante um abastecimento aumentado de nutrientes na região que apresenta a inflamação. A vasodilatação induz hiperemia representada através do rubor e calor. São poucos estudos que fazem avaliação da variável calor, em animais de laboratório não foi encontrado nenhuma pesquisa, o que se torna limitado a discussão.

#### 4.8 Medidas de dor e rigidez

Nas tabelas 8 e 9, pode-se perceber que ao decorrer das induções, os ratos foram melhorando os sinais e sintomas referentes a variável dor com redução da claudicação, observada durante as avaliação com realização da marcha e da rigidez com melhora da mobilidade articular, principalmente na diferença entre a VI e VII avaliação, apontando significância de  $p < 0,05$  nos grupos 3, 4 e 5, porém olhando as frequências absolutas e

relativas percebe-se que na variável dor nos três grupos apresentaram resultados bem semelhantes, já na variável rigidez os grupos 4 e 5 apresentam melhores resultados. Esse resultado positivo das variáveis de dor e rigidez se deu através da apiterapia e do exercício, pela regulação da resposta imune, ou seja, pela ação anti-inflamatória e antinociceptiva devido os componentes presentes na apitoxina, como a melitina, apamina e peptídeo MCD e o exercício minimizou o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

**Tabela 8** – Resultado das medidas de dor nos diferentes grupos analisados (continua).

Variável	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<b>Dor I</b>										
Completo desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
<b>Dor II</b>										
Completo desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
<b>Dor III</b>										
Completo desuso	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
Intermitente desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Dor IV</b>										
Completo desuso	0	0	09	90	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	01	10	08	80	02	20	02	25
Grave	0	0	0	0	02	20	08	80	06	75
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Dor V</b>										
Completo desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	10	100	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	06	60	04	40	02	25
Leve	0	0	0	0	04	40	06	60	06	75
Normal	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Dor VI</b>										
Completo desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	04	40	01	10	0	0	0	0
Grave	0	0	06	60	0	0	0	0	01	12,5
Leve	0	0	0	0	09	90	08	80	07	87,5
Normal	10	100	0	0	0	0	02	20	0	0
<b>Dor VII</b>										

Completo desuso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intermitente desuso	0	0	04	40	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	02	20	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	04	40	07	70	07	70	08	80
Normal	10	100	0	0	03	30	03	30	0	0

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

**Tabela 9 – Resultado das medidas de rigidez nos diferentes grupos analisados (continua).**

Variável	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
<b>Rigidez I</b>										
Ausente	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Rigidez II</b>										
Ausente	10	100	10	100	10	100	10	100	08	100
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Rigidez III</b>										
Ausente	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	10	100	10	100	10	100	08	100
<b>Rigidez IV</b>										
Ausente	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	02	20	04	40	0	0
Moderada	0	0	01	10	07	70	06	60	08	100
Grave	0	0	09	90	01	10	0	0	0	0
<b>Rigidez V</b>										
Ausente	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	0	09	90	09	90	08	100
Moderada	0	0	09	90	01	10	01	10	0	0
Grave	0	0	01	10	0	0	0	0	0	0
<b>Rigidez VI</b>										
Ausente	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	0	0	06	60	10	100	10	100	08	100
Moderada	0	0	03	30	0	0	0	0	0	0
Grave	0	0	01	10	0	0	0	0	0	0
<b>Rigidez VII</b>										
Ausente	10	100	0	0	01	10	03	30	01	12,5
Leve	0	0	07	70	07	70	07	70	07	87,5
Moderada	0	0	03	30	02	20	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 9 – Resultado das medidas de rigidez nos diferentes grupos analisados (continuação).**

Variável	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV		Grupo V	
	F	%	F	%	F	%	F	%	F	%
Moderada	0	0	03	30	02	20	0	0	0	0
Grave	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, estando relacionada a lesões reais ou

potenciais”. Ela, foi introduzida, em 1996 pela *American Pain Society*, como quinto sinal vital (CIENA *et al.*, 2008).

Na artrite, a dor tem origem em estruturas articulares e periarticulares devido a cartilagem não apresentar raízes nervosas. Entre as estruturas articulares, o osso pode apresentar dor em decorrência do aumento da pressão intramedular, ou pela lesão do osso subcondral, aumento do periósteo pelos osteófitos e fibrose na cápsula articular, e os tecidos periarticulares como tendões, ligamentos, bursas e outras estruturas de partes moles são distendidos (LIANZA, 2004; DELISA, 2002).

Para avaliação da dor foi feito uma adaptação do teste Rotarod. Os animais foram acomodados em um espaço livre para que fosse observado a presença da claudicação durante cinco minutos, sendo classificada como: 5- significa uso normal do membro; 4- claudicação leve; 3- claudicação grave; 2- intermitente desuso da pata afetada e 1- completo desuso da pata afetada (KALFF *et al.*, 2010).

Durante a investigação da hiperalgesia, os grupos III, IV e V obtiveram posição de destaque na redução do quadro algico, o que implica dizer que os tratamentos com exercício, apitoxina e associação das técnicas apresentaram melhores resultados. Em um estudo realizado por Gomes (2014) onde foi observado os efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre o sintoma de dor, verificou que o exercício, principalmente a variável, realizado com aumento gradativo do tempo apresentou efeito em diminuir a nocicepção nas articulações estudadas.

Em uma pesquisa desenvolvida por Buttler *et al.* (1991), em animais com indução de CFA contendo 300 mg de *Micobacterium butyricum* na articulação Tíbio Tarsica de ratos, no foi utilizado o protocolo de nado progressivo, aumentados de 5 a 15 minutos, com frequência de três vezes por semana, durante quatro semanas, houve alterações com relação ao limiar de dor em resposta ao teste de pressão da pata, o que corrobora com o estudo.

Morsoleto (2005) mostrou em seu estudo a eficácia da apitoxina e a da fonoforese associado a apitoxina, onde ambas as terapêuticas demonstraram eficiente no reparo tecidual e consequente regeneração dos contornos articulares quando comparados com a aplicação apenas de ultrassom.

Outra característica da artrite é a rigidez, definida como limitação do movimento, o grau de mobilidade mostrar-se diminuído pela fibrose capsular, osteofitose, irregularidade das superfícies articulares (MORAIS, 2014).

No que tange a avaliação da rigidez intra-articular foi determinada por meio de mobilização manual da articulação baseado em Evans *et al.* (1960) em comparação com a da

articulação contralateral, desta forma, verificou a resistência à flexão ou extensão, onde foi classificada como ausência na limitação de movimento, leve limitação, moderada limitação e grave com limitação completa do movimento. Ao realizar avaliações, foi observado melhora do quadro na primeira semana de intervenção, com evolução significativa já no final da intervenção (avaliação VII) para os grupos que IV e V.

Na pesquisa de Carlo *et al.* (2007), foi realizado a imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos, com grupos divididos sem imobilização (G1), com imobilização do joelho direito por 45 dias (G2), com imobilização e remobilização com atividade livre por cinco semanas (G3), imobilização e remobilização com atividade livre e natação por cinco semanas (G4), onde conclui-se que tanto a atividade livre quanto sua associação com a natação (grupos 3 e 4) favoreceram o retorno das condições biomecânicas e da cápsula articular (rigidez), anteriores à imobilização.

#### **4.9 Parâmetros hematológicos**

Com base na tabela 10 por meio do hemograma obtiveram-se as médias e desvio padrão dos valores, correspondente com destaque a cada parâmetro por grupo. Os valores de glóbulos brancos relativos de leucócitos (%): linfócitos  $57,4 \pm 5,91$  para o feminino e  $55,0 \pm 4,00$  para o masculino no grupo controle, se comparado, os demais grupos encontram-se com valores reduzidos, isso quer dizer que existe alguma doença autoimune, a exemplo da artrite reumatoide; os eosinófilos no grupo controle para o feminino  $2,14 \pm 0,69$  e masculino  $1,67 \pm 0,57$ , ao correlacionar com os demais grupos, os valores dos mesmos apresentam-se alterados com aumento  $2,50 \pm 1,22$  no grupo IV, e reduzido  $1,00 \pm 0,00$  no grupo V, isso justifica devido alteração do sistema imunológico ou processo alérgico; para os monócitos no grupo controle  $5,71 \pm 1,38$  em fêmeas e  $4,67 \pm 2,08$  em machos, ao observar os grupos foram identificados valores diversificados para mais e para menos, isso se deve ao estresse e presença de quadro inflamatório

Os bastonetes com  $0,00 \pm 0,00$  encontram-se dentro dos padrões de normalidade se comparado com literaturas e grupo controle para ambos os sexos. Os segmentos mostraram-se alterados com valores altos em todos os grupos, comparados ao grupo controle, isso se deve ao processo inflamatório. Das series vermelhas os valores das médias de leitura e grupo controle da hemoglobina (Hb)  $15,0 \pm 0,77$  em fêmeas e  $15,7 \pm 0,20$  em machos hematócritos ou volume globular (VG)  $40,6 \pm 2,06$  para o feminino e  $43,1 \pm 0,62$  no masculino, também apresentam valores dentro dos padrões de normalidade, descartando presença de anemia.



Em relação ao volume corpuscular médio (VCM) em feminino  $49,8 \pm 1,30$  e  $47,6 \pm 1,60$  para o masculino e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) com  $36,9 \pm 0,38$  para fêmeas e  $36,6 \pm 0,30$  para macho, onde seus valores de referência baseado em pesquisas e grupo controle estão normais, já a hemoglobina corpuscular média (HCM) encontra-se alterada nos grupos II, III, IV e V em fêmeas com destaque para o maior valor no grupo V  $24,6 \pm 13,5$  devido o processo inflamatório instalado. Os parâmetros clínicos apresentados mostram valores baseados em alguns estudos, porém esses resultados podem variar de acordo com cada biotério. No estudo foi observado valores com significado positivo para inflamação em alguns grupos a exemplo do II, devido a indução e não tratamento, ou até mesmo presença de inflamação por meio de outros fatores extrínsecos e intrínsecos destacados no grupo I e ausência e/ou redução do quadro inflamatório em grupos I, III, IV e V.

**Tabela 10** – Resultado dos parâmetros clínicos dos ratos participantes do estudo (continua).

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>	<b>Grupo V</b>
	<b>Media/DP</b>	<b>Media/DP</b>	<b>Media/DP</b>	<b>Media/DP</b>	<b>Media/DP</b>
<b>Glóbulos brancos</b>					
Feminino	$2,27 \pm 1,36$	$4,51 \pm 3,49$	$4,26 \pm 1,60$	$6,01 \pm 4,64$	$4,46 \pm 1,00$
Masculino	$5,96 \pm 1,25$	$5,10 \pm 1,99$	$5,12 \pm 1,42$	$5,00 \pm 1,10$	$5,85 \pm 0,35$
<b>Linfócitos</b>					
Feminino	$57,4 \pm 5,91$	$55,1 \pm 8,32$	$55,5 \pm 5,08$	$50,0 \pm 6,38$	$51,3 \pm 11,6$
Masculino	$55,0 \pm 4,00$	$51,7 \pm 6,94$	$51,0 \pm 2,44$	$52,0 \pm 12,6$	$50,5 \pm 3,53$
<b>Eosinófilos</b>					
Feminino	$2,14 \pm 0,69$	$1,83 \pm 0,75$	$1,50 \pm 0,83$	$2,50 \pm 1,22$	$1,83 \pm 0,75$
Masculino	$1,67 \pm 0,57$	$1,75 \pm 0,95$	$1,75 \pm 0,95$	$2,00 \pm 0,81$	$1,00 \pm 0,00$
<b>Monócitos</b>					
Feminino	$5,71 \pm 1,38$	$5,67 \pm 1,21$	$6,50 \pm 1,37$	$7,50 \pm 3,78$	$4,67 \pm 2,33$
Masculino	$4,67 \pm 2,08$	$5,50 \pm 1,00$	$5,25 \pm 0,50$	$5,50 \pm 2,38$	$6,50 \pm 3,53$
<b>Bastonetes</b>					
Feminino	$0,00 \pm 0,00$	$0,17 \pm 0,40$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,33 \pm 0,81$
Masculino	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,50$	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,50$	$0,50 \pm 0,70$
<b>Segmento</b>					
Feminino	$34,7 \pm 6,67$	$37,0 \pm 8,67$	$36,5 \pm 6,25$	$40,0 \pm 3,34$	$42,5 \pm 14,2$
Masculino	$38,6 \pm 2,30$	$40,7 \pm 6,99$	$42,0 \pm 2,94$	$40,2 \pm 13,9$	$41,5 \pm 6,36$
<b>Glóbulos vermelhos</b>					
Feminino	$8,17 \pm 0,46$	$7,61 \pm 0,55$	$7,89 \pm 0,32$	$7,54 \pm 0,86$	$7,81 \pm 0,26$
Masculino	$9,07 \pm 0,26$	$8,41 \pm 0,40$	$8,69 \pm 0,29$	$8,69 \pm 0,30$	$8,93 \pm 0,11$
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>					
Feminino	$15,0 \pm 0,77$	$14,9 \pm 0,99$	$15,6 \pm 0,64$	$14,7 \pm 1,08$	$14,9 \pm 0,80$
Masculino	$15,7 \pm 0,20$	$15,2 \pm 0,36$	$16,2 \pm 0,53$	$15,2 \pm 0,36$	$15,7 \pm 0,35$
<b>Hematócrito (%)</b>					
Feminino	$40,6 \pm 2,06$	$38,1 \pm 2,56$	$40,2 \pm 2,01$	$38,7 \pm 4,28$	$40,1 \pm 1,77$
Masculino	$43,1 \pm 0,62$	$39,7 \pm 1,55$	$42,1 \pm 1,10$	$42,4 \pm 0,60$	$43,7 \pm 0,49$
<b>VCM (fL)</b>					

Feminino	49,8±1,30	50,2±0,86	51,0±0,78	51,4±1,08	51,4±0,87
Masculino	47,6±1,60	47,3±0,82	48,5±0,71	48,9±2,08	49,0±0,07
<b>HCM (g/dL)</b>					
Feminino	18,3±0,41	19,6±0,49	19,8±0,75	19,6±1,06	24,6±13,5
Masculino	17,4±0,65	18,1±0,54	18,6±0,33	17,5±0,93	17,6±0,14
<b>CHCM (g/dL)</b>					
Feminino	36,9±0,38	39,2±1,11	38,9±1,24	38,2±1,79	34,3±7,60
Masculino	36,6±0,30	38,3±0,59	38,5±0,35	35,8±0,44	35,9±0,35

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2020.

Bem sabe-se que o hemograma, é um exame prático e econômico, está dividido em duas partes: o eritrograma que inclui a contagem total de eritrócitos, dosagem de hemoglobina e hematócrito e o leucograma. Este é solicitado para avaliação da saúde do animal, diagnósticos de diversas patologias, presença de processo infeccioso e para avaliar a progressão de doenças (GONZÁLEZ; SILVA, 2008).

Os resultados obtidos no estudo foram comparados ao Grupo I, referente ao controle, bem como as referências da literatura. Todos esses são essenciais para interpretação, discussão dos valores e ligação com as possíveis complicações patológicas (MENEZES, 2013).

Com base nos Parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* de ambos os gêneros os resultados das análises hematológicas não demonstraram diferenças significativas em comparação com as pesquisas de Branco *et al.* (2011) e Melo *et al.* (2012) exceto os valores de glóbulos brancos relativos de leucócitos como os linfócitos, eosinófilos e monócitos que estão alterados em decorrência a indução da artrite que provoca processo inflamatório, bem como os sintomas levam o estresse em especial devido o quadro álgico. A hemoglobina corpuscular média (HCM) também apresenta alterada, supondo que seja devido o quadro inflamatório, porém essa alteração poderia estar associada a falta de calibração ou o empilhamento/aglutinação das hemácias no processo inflamatório.

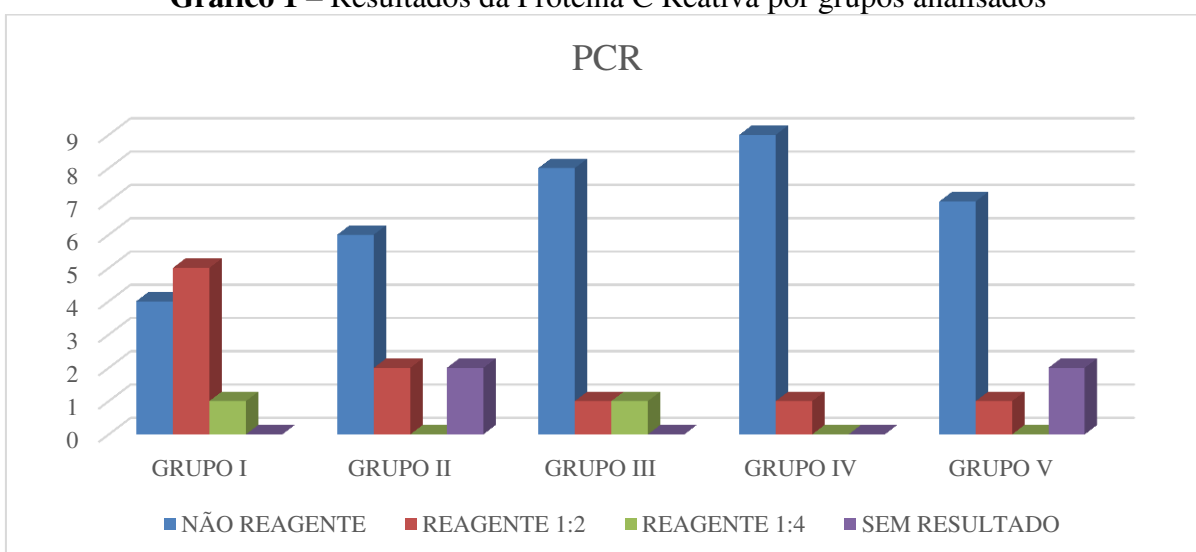
Nota-se em alguns estudos que os resultados hematológicos não apresentaram igualdade entre faixas de valores. Esta falta de similaridade decorre de vários fatores, entre eles o equipamento e reagentes para dosagens, métodos de análise seja ela manual ou automatizada, falha de padronização quanto à dieta, tempo de jejum e, por fim, o estresse com os animais durante a coleta. Por isso, hoje cada laboratório ou biotério deve estabelecer um conjunto de valores próprios (MELO *et al.*, 2012). Ainda de acordo com o autor, os parâmetros hematológicos evidenciaram que os valores de referência dos ratos *Wistar* são parecidos aos valores de referência para humanos, porém com exceção da contagem de hemácias e de plaquetas, VCM, HCM e CHCM. Em ratos estes as hemácias e plaquetas

apresentam maior quantidade, levando uma maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação.

#### 4.10 Amostra com concentração de Proteína C Reativa

No gráfico 1, os dados apontam que o uso da apitoxina no grupo IV se torna mais efetivo na diminuição nos graus de inflamações referente ao exame de Proteína C Reativa, quando comparados com a utilização dos outros métodos de tratamento descritos nos diferentes grupos.

**Gráfico 1 – Resultados da Proteína C Reativa por grupos analisados**



**Fonte:** Dados da pesquisa, 2020.

A Proteína C Reativa é uma das Proteínas de Fase Aguda (PFA), no qual a concentração sérica aumenta ou diminui pelo menos 25% durante estados inflamatórios. O valor da PCR é determinado pela PFA e na presença de quadros inflamatórios suas concentrações séricas alteram-se mais rapidamente (AGUIARA, 2013). O método para determinação qualitativa e semiquantitativa da PCR foi realizado através do kit de Biolátex PCR do laboratório Bioclin<sup>®</sup>. O exame ocorre por reação de aglutinação de partículas de látex recobertas com Gama-Globulina anti-PCR, especialmente tratadas para evitar aglutinações inespecíficas.

A aglutinação é visível em amostra com concentração de PCR igual ou superior a 6 mg/L, de acordo com as referências estabelecidas pelos Padrões Internacionais da OMS. Valores menor de 6mg/L o resultado como negativo, ou seja, não reagente. Para aqueles com diluição de 1/2 o valor de concentração é 12 mg/L e por fim os com diluição de 1/4 o valor é 24 mg/L, sendo esses reagentes, indicativo de processo inflamatório em atividade, quer seja

de origem infecciosa (pneumonia, tuberculose) ou não infecciosa (febre reumática em atividade, artrite reumatóide, lupus eritematoso). O teste também é eficaz no acompanhamento de condutas terapêuticas e também para prognóstico das inflamações (RODRIGUES, 2015).

Sabe-se que a inflamação é uma característica principal da artrite, o teste PCR é de suma importância para detectar a presença ou ausência desse sinal. Ao término do estudo foi observado focos de inflamação presentes em grupos I e III, isso devido a possíveis problemas de ordem imunológica, ocorrida no grupo I já que no mesmo não foi realizada indução da inflamação e no grupo III em decorrência a conduta aplicada, o exercício.

Em alguns grupos da pesquisa não foi possível observar resultados de PCR, como ocorreu no estudo de Galletti *et al.* (2012) onde não foi capaz de detectar esta proteína no soro dos ratos avaliados. A justificativa é, que poderá estar relacionado com a sensibilidade do método de coleta, já que o kit utilizado é para ser humano e que é capaz de detectar níveis de PCR apenas em concentrações iguais ou superiores a 0,05 mg/L. sabe-se que a concentração de PCR em ratos é 100 vezes maior que em humanos com valores entre 30 e 60 mg/L (39,40). Ainda para os autores o não reconhecimento de PCR esteja associada ao fato de que os testes laboratoriais para dosagem de PCR em humanos são imunoquímicos, com anticorpos específicos para esta proteína. Como a PCR de ratos tem apenas 70% de homologia com a PCR de humanos, é possível que os anticorpos utilizados no método não sejam capazes de interagir com a PCR de ratos.

Utilizando o teste Qui-quadrado, pôde-se perceber na tabela 11, a seguir, que há relação direta entre as variáveis que indicam sinais e sintomas de inflamação nos ratos, com a proteína C reagente, tendo um *p* valor <0,05 em todas as variáveis cruzadas.

**Tabela 11** – Sinais e sintomas da inflamação relacionadas com a proteína C reagente (continua).

Variável	PROTEÍNA C REAGENTE				P
	Sem resultado	Não reagente	Reagente 1:2	Reagente 1:4	
<b>Rubor</b>					0,00
Presente	02	07	01	0	
Ausente	0	27	09	02	
<b>Calor</b>					0,00
Presente	02	08	02	0	
Ausente	0	26	08	02	

**Edema**

**Tabela 11** – Sinais e sintomas da inflamação relacionadas com a proteína C reagente (continuação).

Variável	PROTEÍNA C REAGENTE				P
	Sem resultado	Não reagente	Reagente 1:2	Reagente 1:4	
Presente	02	24	04	01	0,00
Ausente	0	10	06	01	
<b>Dor</b>					0,01
Intermitente D.	01	02	01	0	
Grave	0	02	0	0	
Leve	01	21	03	01	
Normal	0	09	06	01	
<b>Rigidez</b>					0,02
Ausente	0	08	06	01	
Leve	02	22	03	01	
Moderada	0	04	01	0	

**Fonte:** Dados da pesquisa, 2020.

De acordo com Woolf (2003) os sinais clínicos da inflamação são dor, edema e rigidez que caracteriza pela limitação dos movimentos das articulações acometidas. Ele ainda complementa que ao realizar o exame físico, observa-se derrame intra-articular, calor e, eventualmente. Segundo as diretrizes para diagnóstico da artrite reumatoide. Quando identificados esses sinais de forma precoce, é necessário a solicitações de exames complementares com os de imagem, entre eles podemos eleger as radiografias e ultrassonografia, bem como exames laboratoriais como a proteína C-reativa, para avaliar a elevação de provas de atividade inflamatória (MOTA, *et al.*, 2013).

## 5 CONCLUSÃO

Durante toda a pesquisa foi seguido as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), prezando pela utilização humanitária de animais. Através das condutas utilizando o tratamento opoterápico com apitoxina grupo IV e associação com exercícios progressivos através da natação e apitoxina grupo V, obtiveram resultados significativos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos na artrite induzida.

Na avaliação após a intervenção, no variável edema foi observado pouca redução em todos os grupos, porém o grupo IV apresentou destaque, com média de  $1,14 \pm 0,2$  em comparação com a avaliação inicial  $1,93 \pm 0,17$ , nos demais indicadores de inflamação como rubor 90% dos animais apresentaram ausência.

No que tange a variável calor, o grupo III representado pela intervenção com exercício obteve melhor resultado 100% em comparação ao grupo IV com 90% de ausência da hipertermia, porém ainda é positivo o resultado. Com base nas medidas de dor e rigidez os grupos III, IV e V obtiveram melhores resultados com destaque para os grupos IV e V com dor leve em 70% e normal 30%, já na rigidez ausente ficou presente em 30% no grupo IV e 12,5% no grupo V. E, por fim, com relação ao exame laboratorial, mais precisamente a Proteína C Reativa, o grupo IV apresentou maior efeito na diminuição da inflamação em comparação aos demais.

Diante de vários desafios, conseguimos evidenciar que o método alternativo foi de suma importância para elucidação de fenômenos fisiopatológicos da doença.

Portanto, conclui-se que apesar dos resultados positivos, é recomendável novas pesquisas com condutas (exercícios e formulações variadas) para resolutividade da dor ou aflição, ou dano passageiro da patologia, gerando assim melhora na funcionalidade e qualidade de vida.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, A. F. **Avaliação da qualidade da apitoxina de *Apis Mellifera* e sua estabilidade em formulação de uso tópico**. 2015. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2015.
- AGUIARA, F. J. B. *et al.* Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.59, n.1, p. 85-92, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0104423013705670>. Acesso em: 16 dez. 2019.
- ALMEIDA, B. A. *et al.* A utilização da apitoxina na apiterapia e seus efeitos no tratamento de patologias. **Revista Acta Apícula Brasílica**, v. 5, n. 1, 2017. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/APB/article/view/5597/6248>. Acesso em: 16 dez. 2019.
- BRANCO, A. C. S. C. *et al.* Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.2 p. 209-214, 2011.
- BECK, B. F. The bible of bee venom therapy: bee venom, its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions. New York: Health Resources Press, 1997, p. 260.
- BEIGUELMAN, B. **Os sistemas sanguíneos eritrocitários**. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2003.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 42, de 20/12/99**. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 4, de 3/03/00**. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune disease. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 70, n. 6, p. 849-860, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739546>. Acesso em: 17 dez. 2019.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. 2009. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm). Acesso em: 05 jun. 2018.
- BUTLER, S. H. *et al.* Increase in "pain sensitivity" induced by exercise applied during the onset of arthritis in a model of monoarthritis in the rat. **International Journal of Tissue Reactions**. v. 13, n. 6, p. 299-303, 1991.

CAMARGO, L. L. **Caracterização farmacológica do papel da hemopressina e das fibras c no modelo de artrite induzida por antígeno em ratos.** 2007.

(Mestrado Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CANNON, G. W. et al. Induction of arthritis in DA rats by incomplete Freund's adjuvant. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 20, n. 1, p. 7-11, 1993.

CARLO, R. J. *et al.* Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n.2, p.363-370, 2007. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352007000200015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352007000200015). Acesso em: 20 dez. 2019.

CIENA, A. P. *et al.* Influência da intensidade da dor sobre as respostas nas escalas unidimensionais de mensuração da dor em uma população de idosos e de adultos jovens. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, n. 29, v.2, p.201-12, 2008.

DANTAS, C. G. et al. Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. **Revista ibero-americana de ciências ambientais**, v. 4, n. 2, 2013. Disponível em: <http://www.docplayer.com.br/36994385-Revista-ibero-americana-de-ciencias-ambientais-aquidaba-v-4.html>. Acesso em: 16 jun. 2018.

DELISA, J. A. **Tratado de Medicina de Reabilitação: Princípios e Práticas.** 3. ed. v. 1. São Paulo: Manole, 2002.

EVANS, E. B. *et al.* Experimental immobilization and remobilization of rat knee joints. **J. Bone Joint Surg.**, v. 642A, p.737-58, 1960.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, R.A; BARROS FILHO, T. E. P. Padronização da técnica a captação do potencial ação evocado motor em ratos através da estimulação elétrica transcraniana. **Acta Ortop Bras.** v.13, n. 3, 2005. Disponível em: [www.redalyc.org/pdf/657/65713302.pdf](http://www.redalyc.org/pdf/657/65713302.pdf). Acesso em: 20 dez. 2019.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A; Hymenoptera Stings. Clinical Techniques in Small Animal Practice. **ELSEVIER**, v. 21, n. 4, p. 194-204, nov. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096286706000636>. Acesso em: 05 jun. 2018.

FRANÇA, F.O.S.; MEDEIROS, C.R. Acidentes por Abelhas e Vespas. *In*: CARDOSO J. L. C. *et al.* **Animais Peçonhentos no Brasil.** 1ª Edição. 26, 2003. p. 244-245.

FONTELLES, M. J. *et al.* Metodologia da pesquisa científica: diretrizes para a elaboração de um protocolo de pesquisa. **Rev. para. Med.**, v. 23, n. 3, jul.-set. 2009.

GALLETTI, J. et al. Avaliação dos parâmetros biométricos de obesidade e níveis séricos de pcr-as em ratos obesos jovens. *In*: mostra interna de trabalhos de iniciação científica, v. 6, 2012, Maringá. **Anais [...]** Maringá: Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. Eletrônico ISBN 978-85-8084-413-9. Disponível em: <https://>



[www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/vi\\_mostra/juliana\\_galletti\\_2.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/vi_mostra/juliana_galletti_2.pdf). Acesso em: 16 dez. 2019.

GEHARDT, T. E.; SILVEIRA, D. T. (Org.). **Métodos de Pesquisa**. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

GIL, A. C. **Métodos e Técnicas de Pesquisa Social**. 6 ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GOMES, R.P. et al. Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 54, n. 2, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042014000200083](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042014000200083). Acesso em: 17 dez. 2019.

GOMES, R. P. **Atividade física no tratamento de artrite induzida por Adjuvante de Freund**: Efeitos na nocicepção, edema e migração celular. 2008. (Mestrado em Ciências do Movimento Humano) – Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC, Florianópolis, 2008.

GONÇALVES, L. S. Expansão da apicultura brasileira e suas perspectivas em relação ao mercado apícola internacional. *In: Anais [...] XV Congresso Brasileiro de Apicultura e 1º Congresso Brasileiro de Meliponicultura*, Natal/RN, 2004. Disponível em: <http://www.ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42445/>.pdf. Acesso em: 21 jun. 2018.

GOELDNER, I. *et al.* Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jor. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 47, n. 5, p. 495-503, out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n5/v47n5a02.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2018.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Patologia clínica veterinária: Texto introdutório de apoio ao curso de especialização em análises clínicas veterinárias. Porto Alegre, 2008. Disponível em: [https://www.ufrgs.br/lacvet/livros/Analises\\_Clinicas\\_Vet.pdf](https://www.ufrgs.br/lacvet/livros/Analises_Clinicas_Vet.pdf). Acesso em: 20 dez. 2019.

HALLERT, F. et al. Rheumatoid arthritis is already expensive during the first year of the disease (the swedish tira project). **Rheumatology (oxford)**., v. 43, n. 11, p.74-1382, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280570>. Acesso em: 01 abr. 2018.

KALFF, K. M. *et al.* Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **European Journal of Pharmacology**, v.641, n.2-3, p.108-113, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299910004723>. Acesso em: 20 dez. 2019.

KAZIMÍROVÁ, M. Pharmacologically Active Compounds from Ticks and Other Arthropods and Their Potential Use in Anticancer Therapy. **Phytochemicals as Inducers of Cell Death Mechanisms**, v.1, p.163-182, juh. 2012. Disponível em: [https://rd.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-4575-9\\_7](https://rd.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-4575-9_7). Acesso em: 05 jun. 2018.

LAURINDO, I. M. M. *et al.* Consenso Brasileiro para o Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**., v. 42, n. 6, p.355-361, 2002.

LEITE, G. L. D.; ROCHA, S. L. Apitoxina, Montes Claros, v. 7, n. 1, jan./jun. 2005. **Setor de fitotecnia do núcleo de ciências agrárias (NCA) / Universidade Federal de Minas**  
Disponível em: <https://file:///e:/mestrado/artigo%20mestrado/intro3.pdf>. Acesso em: Acesso em: 16 jun. 2018.

LIANZA, S. **Medicina de Reabilitação**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

LUNDSTRÖM, E. *et al.* Gene-environment interaction between the DRb1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 6, p. 1597-603, 2009.

MAIA, A. B. **O potencial terapêutico da apitoxina**. Mensagem Doce: Apacame, 2012.  
Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/66/apitoxina.htm>. Acesso em: 05 jun. 2018.

MANGINI, C.; MELO, F. A. F. Artrite reumatóide, terapia imunossupressora e tuberculose. **Revista brasileira de reumatologia**, São Paulo, v. 43, n. 6, nov./dez. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042003000600002>. Acesso em: 16 jun. 2018.

MARTIGNANO, C. C. S. *et al.* Avaliação do ultrassom sobre a hiperalgesia e o edema em joelhos de rato Wistar e interferências de um inibidor de opioides endógenos. **Fisioterapia Brasil**, v.14, n. 4, p. 289-293, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280719075>. Acesso em: 17 dez. 2019.

MELO, M. G. D. *et al.* Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 8, n. 4, p. 1-8, 2012. Disponível em: <https://scientiaplenu.emnuvens.com.br/sp/article/view/494/445>. Acesso em: 17 dez. 2019.

MENEZES, R. R. **Monoartrite induzida por Adjuvante Completo de Freund em Ratos Holtzman e avaliação dos efeitos induzidos pelo tratamento crônico com Tiamina ou Riboflavina**. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MODANESI, M. S. **Produção de apitoxina por abelhas *Apis mellifera* L. e seu efeito na expressão de genes relacionados ao estresse**. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MOREIRA, D. R. Apiterapia no tratamento de patologias. **Revista Fapciência**, Apucarana, v. 9, n. 4, p. 21-29, 2012. Disponível em: [www.cesuap.edu.br/fapciencia/edicao\\_2012/004.pdf](http://www.cesuap.edu.br/fapciencia/edicao_2012/004.pdf). Acesso em: 16 dez. 2019.

MORAIS, S. V. **Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio intra-articular em joelho de ratos**. (Mestrado em Princípios da cirurgia) – Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba. 2014.

MORSOLETO, F. M. S. *et al.* Análise radiográfica de Artrite induzida, submetida à Apitoxina, veiculada com Ultrassom em fêmeas de Ratos Wistar *Rattus norvegicus* (MAMMALIA; RODENTIA). Fortaleza **Anais [...]** 57ª Reunião Anual da SBPC, Fortaleza,

2005. Disponível em:

[http://www.sbpnet.org.br/livro/57ra/programas/SENIOR/RESUMOS/resumo\\_1956.html](http://www.sbpnet.org.br/livro/57ra/programas/SENIOR/RESUMOS/resumo_1956.html). Acesso em: 20 dez. 2019.

MOTA, L. M. H. *et al.* Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo v.53, n.2, 2013. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0482-50042013000200003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0482-50042013000200003&script=sci_arttext). Acesso em: 20 dez. 2019.

NAGAKURA, Y. *et al.* Allodynia and hyperalgesia in Adjuvant-Induced Arthritic rats: Time course of progression and efficacy of analgesics. **J Pharm Exp Ther.** v. 306, n. 2, p. 490-497, 2003. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/10775549\\_](https://www.researchgate.net/publication/10775549_). Acesso em: 17 dez. 2019.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química, 2013. 234 p.

OKUA, C. E.; PINHEIRO, G. R. C.; ARAÚJO, P. M. P. Instrumentos de avaliação funcional da mão em pacientes com artrite. **Reumatóide. Fisioter. Mov.**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 221-228, abr./jun. 2009. Disponível em:

<https://periodicos.pucpr.br/index.php/fisio/article/view/19415>. Acesso em: 16 jul. 2018.

OLIVEIRA, M. B. *et al.* Avaliação isocinética do tornozelo de pacientes com artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v.55, n.4, Jul./Ago 2015. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042015000400318](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042015000400318). Acesso em: 05 jun. 2018.

ORLANDINI, L. F. Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em Ratos Wistar expostos à amônia por inalação. (Mestrado Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PERUCA, R. D. *et al.* Projeto de fortalecimento da apicultura dos agricultores familiares no estado de Mato Grosso do Sul, 2002. 13 p.

RALL, L. C.; ROUBENOFF, R. Benefits of exercise for patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition in Clinical Care.** v. 3. p. 209–15, 2000. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1523-5408.2000.00053.x>. Acesso em: 16 dez. 2019.

RICHARDSON, R. J. **Pesquisa social: métodos e técnicas**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 1999.

RICCI, N. A.; COIMBRA, I. B. Exercício físico como tratamento na osteoartrite de quadril: uma revisão de ensaios clínicos aleatórios controlados. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n.4, p. 273-280, jul./ago. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v46n4/31823.pdf>.

Acesso em: 16 jun. 2018.

RODRIGUES, L. C. C. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato

hidroalcoólico do caroço de abacate sobre a peritonite induzida pela carragenina em ratos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 367-376, 2015. Disponível em: <https://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/2305>. Acesso em: 16 dez. 2019.

SAKAGUCHI S.; SAKAGUCHI N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. **Sciencedirect**. v.17, n.6 p.589-94, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791505001561>. Acesso em: 16 dez. 2019.

SZEKANECZ Z.; KOCH A. E. Update on synovitis. **Curr Rheumatol Rep**. v. 3, n. 1, p. 53-63, 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11926-001-0051-0>. Acesso em: 16 dez. 2019.

SOUZA, J. A. *et al.* A apicultura em Rondônia (Amazônia legal): estudo de caso sobre o arranjo produtivo local da apicultura no cone sul. **Revista estudo & debate**, Lajeado, v. 23, n. 2, p. 115-137, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication>. Acesso em: 16 jun. 2018.

SOUZA, L. M. **Modelagem por Homologia de Estruturas Proteicas do Veneno de Apis mellifera**. 2008. Monografia (Graduação) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008. 72f. Disponível em: [http://www.ffclrp.usp.br/dfm/tcc/2008/Monografia\\_Mariana\\_Laureano.pdf](http://www.ffclrp.usp.br/dfm/tcc/2008/Monografia_Mariana_Laureano.pdf). Acesso em: 26 abr. 2018.

SOUZA, R. *et al.* Consolidação da apicultura no assentamento amparo. *In*: Encontro de ensino, pesquisa e extensão. **Anais [...]** Dourados/MS, 2014. Disponível em: <http://www.https://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/526.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2018.

TOBAR, R. A. V.; ANDRADE, B. K. C.; GÓNGORA, F. B. Apiterapia como modalidade terapêutica complementar a la fisioterapia em pacientes com artritis reumatoide. **Revista Facultad Ciencias de la Salud: Universidad del Cauca**. v.12, n.1, p. 9-18 2010. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5816961>. Acesso em: 17 dez. 2019.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **Journal of Experimental Medicine**. v. 146. p. 857- 868, 1977. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2180804/pdf/je1463857.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.

WOOLF, A. D. How to assess musculoskeletal conditions. History and physical examination. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. v. 17, n.3, p.381-402, 2003

YAMADA, L. M. M. *et al.* Efeito do ômega 3 e da vitamina B12 no espermograma, na histomorfometria dos órgãos reprodutivos e nas temperaturas do corpo com termografia infravermelha em ratos Wistar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.71, n.1, 2019. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352019000100211](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352019000100211). Acesso em: 17 dez. 2019.

ZHANG, L. *et al.* The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats. **Immunology**. v. 98, n.2, p. 267- 272, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2326913/>. Acesso em: 17 dez. 2019.

## **APÊNDICES**











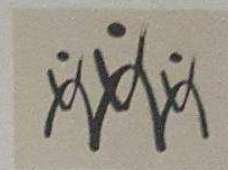


## **ANEXOS**

## Certidão de Aprovação do Comitê em Pesquisa (Comissão de Ética no Uso Animal)



Universidade Federal de Campina Grande  
Centro de Saúde e Tecnologia Rural  
Comitê de Ética em Pesquisa  
(Comissão de Ética no Uso de Animais)  
Av. Santa Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,  
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



A: Prof. Dr. Aucelia Cristina Soares De Belchior

Protocolo CEP/CEUA nº02/2019

**CERTIDÃO**

Certificamos a V.Sa. que seu projeto intitulado "TUDO DA UTILIZAÇÃO DA APITOXINA DE *APPIS MELLIFERA* NA ARTRITE INDUZIDA, EM RATOS *WISTAR*" teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi **Aprovado**, em caráter de **Ad referendum**, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Patos, 19 de Março de 2019.

Rosália Severo de Medeiros  
Coordenadora do CEP/CEUA/UFPA/Patos