



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BEATRIZ LIMA ADJAFRE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VENENO DE *Dinoponera quadriceps* NA FASE
INFLAMATÓRIA AGUDA DA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS
TRAUMÁTICAS EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA
2015**

BEATRIZ LIMA ADJAFRE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VENENO DE *Dinoponera quadriceps* NA FASE
INFLAMATÓRIA AGUDA DA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS
TRAUMÁTICAS EM CAMUNDONGOS

Monografia submetida à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima
Mota

Fortaleza – CE
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

A179a Adjafre, Beatriz Lima.
Avaliação do efeito do veneno de *Dinoponera Quadriceps* na fase inflamatória aguda na cicatrização de úlceras cutâneas traumáticas em camundongos. / Beatriz Lima Adjafre. – 2016.
48 f. : il., color.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

1. Inflamação. 2. Úlceras. 3. Biologia. I. Título.

CDD 570

BEATRIZ LIMA ADJAFRE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO VENENO DE *Dinoponera quadriceps* NA FASE INFLAMATÓRIA AGUDA DA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS TRAUMÁTICAS EM CAMUNDONGOS

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

M. Sc. Luiz André Brizeno
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Ao Criador.
A todos que me inspiram a seguir
questionando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me deu meu bem mais precioso e meu segundo agradecimento: minha família.

Aos meus pais, Marcílio e Verônica, ao meu irmão, Gustavo, e aos meus primos-irmãos, Lucas, Marcela, Renata e Juliana por sempre terem caminhado comigo no meu aprendizado.

Aos meus avós e também à minha terceira avó, aquela que me foi dada como um presente não-merecido, Maria de Lourdes, a minha Nanã.

Ao Prof. Mário Rogério, por se dispor a me orientar durante a realização deste trabalho e mais ainda, orientar minha formação como profissional. Por sua solicitude e dedicação, pelo apoio e incentivo a esta pesquisa, meu muito obrigada.

À Prof^a. Alana Pires por ter aceito o convite para participar da banca.

Ao M. Sc. André Brizeno por se dispor em participar da banca e pela imensurável ajuda prestada ao longo do trabalho.

Aos meus colegas “Laffinenses”, em especial à Timna, Lucas, Gabriel, Dévany, Livia Almeida e Livia de Paulo, que estiveram presentes nos bons e nos maus momentos, sempre com uma “mãozinha” nos experimentos, uma palavra amiga, uma tapioca quente e um copinho de café.

Aos meus amigos de uma vida e muito mais: as 21, as Amadurecidas, os Meninos&Meninas e “Ouimet crew”, com menção especial à Nara, Luana e Vitor. Que nossa amizade perdure até o fim de nossas vidas.

Aos meus maravilhosos presentes do curso de Ciências Biológicas, turma de 2009.1, com os quais pude vivenciar as alegrias e as dificuldades do caminho que escolhemos seguir. Agradecimento especial ao grupo Lado B: Ana Mara, Ítalo, Gabriel, Samuel, Nathan de Paula, Nathan Pinheiro, Antônio Xavier, Iara, Demontier, Bruna e Narcélio Júnior. Um agradecimento também aos dois melhores amigos que a faculdade me ofereceu: Gustavo e Hortência. A vocês, meus queridos, meu muito obrigada pelas noites sem dormir, pelas conversas, pelos abraços, pelos lanches e pela jornada trilhada, que sei que não foi em vão.

Aos meus mestres da faculdade de Ciências Biológicas.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética, minha primeira incursão científica, em especial a Edvar Monteiro, o primeiro a me ensinar como eu poderia me tornar uma cientista. Meu mais sincero agradecimento.

À Universidade Federal, bem como todos os seus funcionários, muito obrigada.

“Acima dos que saltam

há os que voam.” (Desconhecido)

“Todas as substâncias são venenos, não
existe uma que não seja veneno. A dose certa
diferencia um veneno de um remédio.”

(Paracelso)

RESUMO

Úlceras cutâneas são eventos traumáticos que rompem a integridade da pele e causam problemas para o organismo, podendo levá-lo até à morte. O processo cicatricial é dividido em 4 fases (homeostasia, inflamação, proliferação e remodelação) que buscam restaurar a área ulcerada, deixando uma cicatriz esteticamente satisfatória. A dor é um elemento presente durante quase todo o processo de cicatrização e por isso é um dos sintomas clínicos mais estudados. O uso de anti-inflamatórios para combatê-la é bem disseminado, entretanto seus efeitos colaterais ainda causam muitos danos aos pacientes que se submetem a tratamentos de médio a longo prazo, o que resultou no crescimento do estudo de compostos alternativos encontrados na natureza. *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) é um formiga-gigante, endêmica da região nordeste do Brasil, que produz um veneno proteínico cujas propriedades antinociceptivas já foram comprovadas. Sabendo disso, o presente trabalho buscou avaliar a sua ação analgésica no tratamento de úlceras cutâneas, bem como ação anti-inflamatória. O veneno de *D. quadriceps* (DqV) inibiu a hipernocicepção no teste de Von Frey nos tempos 0.5 h ($277,6 \pm 21,9$ g vs. salina: $61,7 \pm 11$ g); 1 h ($269,9 \pm 23,7$ g vs. salina: $71,2 \pm 13,3$ g); 6 h ($285,8 \pm 17,4$ g vs. salina: $107 \pm 17,9$ g); 12 h ($285,9 \pm 49,2$ g vs. salina: $55,6 \pm 15,2$ g); 24 h ($317,5 \pm 37,4$ g vs. salina: $63,2 \pm 19,9$ g); e 48 h ($325,65 \pm 16$ g vs. salina: $77 \pm 22,4$ g). A avaliação do infiltrado de células polimorfonucleares através da análise histológica também mostrou uma redução significativa durante os tempos 0,5 h ($31 \pm 8,66$ PMN) e 6 h ($30 \pm 9,16$ PMN) quando comparado à salina nos mesmo tempos ($88 \pm 9,07$ PMN; $84,33 \pm 20,57$ PMN). Conclui-se que o veneno de *D. quadriceps* tem propriedade antinociceptiva capaz de alterar estados hipernociceptivos.

Palavras-chave: *Dinoponera quadriceps*, veneno, inflamação, efeito antinociceptivo.

ABSTRACT

Cutaneous wounds are traumatic events that break the skin's integrity and cause problems for the body, even leading to death. Wound healing is a process divided into 4 phases (homeostasis, inflammation, proliferation and remodeling) seeking to restore the ulcerated area, leaving an aesthetically satisfactory scar in place. Pain is an element often present throughout the healing process and is, therefore, one of the most studied clinical symptoms. The use of anti-inflammatory drugs to battle it is very widespread, but its side effects still cause a lot of harm to patients undergoing medium to long-term treatments. The study of alternative compounds found in nature has been growing in recent years. *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) is a giant ant, endemic to the northeastern region of Brazil, that produces a proteinaceous venom whose antinociceptive properties have been proved. Thus, the present study evaluated the analgesic action of the venom in the treatment of cutaneous wounds, as well its anti-inflammatory action. The venom of *D. quadriceps* (DqV) inhibited hypernociception on the Von Frey test on the following periods: 0.5 hr (277.6 ± 21.9 g vs. saline: 61.7 ± 11 g); 1 hour (269.9 ± 23.7 g vs. saline: 71.2 ± 13.3 g); 6 hr (285.8 ± 17.4 g vs. saline: 107 ± 17.9 g); 12 hour (285.9 ± 49.2 g vs. saline: 55.6 ± 15.2 g); 24 hr (317.5 ± 37.4 g vs. saline: 63.2 ± 19.9 g); and 48 hr (325.65 ± 16 g vs. saline: 77 ± 22.4 g). The evaluation of polymorphonuclear cells infiltration by histological analysis also showed a significant reduction during 0.5 hr (31 ± 8.66 PMN) and 6 hr (30 ± 9.16 PMN) when compared to saline in the same times ($88 \text{ PMN} \pm 9.07$; 84.33 ± 20.57 PMN). We conclude that *D. quadriceps*'s venom has antinociceptive property.

Keywords: *Dinoponera quadriceps*, venom, inflammation, antinociceptive effect

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
IL-1	Interleucina-1
IL-8	Interleucina-8
MMP	Metaloproteinases de matriz
NO	Óxido nítrico
OH [•]	Radical hidroxila
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PMN	Polimorfonucleadas
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular derivado do endotélio

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Revisão de literatura	15
2.1	Úlceras cutâneas e cicatrização	15
2.2	Dor e nocicepção	18
2.3	Terapias atuais para o tratamento da dor	22
2.3.1	Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES)	23
2.4	Produtos naturais: uma alternativa possível	25
2.5	<i>Dinoponera quadriceps</i> e seu veneno	25
2.6	Objetivos do estudo	27
3	Metodologia	28
3.1	Coleta e manutenção de <i>Dinoponera quadriceps</i>	28
3.2	Extração do veneno	29
3.3	Animais de experimentação	29
3.4	Úlcera cutânea	30
3.5	Grupos de tratamento	30
3.6	Teste dos filamentos de Von Frey	30
3.7	Extração da úlcera	31
3.7.1	Análise histológica	31
3.7.2	Avaliação do infiltrado de polimorfonucleares em lâminas histológicas	31
3.7.3	Análise imunohistoquímica de TNF-alfa em lâminas histológicas	32
3.8	Análise estatística	33
4	Resultados	34
4.1	DqV diminui a hipernocicepção no teste dos filamentos de Von Frey em úlceras cutâneas traumáticas de camundongos	34
4.2	A análise histológica do grupo DqV não mostra redução da inflamação em úlceras cutâneas de camundongos com relação aos grupos controle	35
4.3	DqV diminui a presença de células polimorfonucleares no infiltrado celular em úlceras cutâneas traumáticas de camundongos	36
4.4	A análise imunohistoquímica do grupo DqV não indica redução na expressão de TNF-alfa em úlceras cutâneas de camundongos em relação aos grupos	37
5	Discussão	39
6	Conclusão	42

Referências	43
Anexos	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de cicatrização	16
Figura 2	Inserção das fibras nervosas aferentes no corno dorsal da medula espinhal	21
Figura 3	Síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico	24
Figura 4	Ninho de <i>Dinoponera quadriceps</i>	28
Figura 5	Extração do veneno de <i>D. quadriceps</i>	29
Figura 6	Avaliação da hipernocicepção	34
Figura 7	Fotomicrografias do tecido conjuntivo abaixo da área de úlcera em pele de camundongo	35
Figura 8	Contagem histológica de células polimorfonucleares	36
Figura 9	Fotomicrografias das áreas de úlcera marcadas com anticorpo anti-TNF-alfa em pele de camundongo	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fármacos utilizados no tratamento da dor	23
Tabela 2	Esquema de tratamento dos camundongos	30
Tabela 3	Avaliação de escores histológicos inflamatórios de úlceras cutâneas	36
Tabela 4	Avaliação de escores imunohistoquímicos de úlceras cutâneas	37

1 INTRODUÇÃO

Úlceras cutâneas são eventos traumáticos que desestabilizam a integridade da primeira barreira de defesa do corpo: a pele. A perda desta integridade gera danos ao organismo, podendo levá-lo até mesmo à morte (KONDO; ISHIDA, 2010). Uma úlcera cutânea gera uma inflamação no organismo e este passa por várias etapas até que a integridade seja reestabelecida. O processo cicatricial envolve 4 fases que se sobrepõem: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação, resultando na formação de uma cicatriz (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

A cicatrização de feridas causa um grande desconforto ao paciente por ser um processo que envolve a liberação de mediadores da dor, especialmente durante a fase inflamatória (SAKATA; ISSY, 2004). Esses mediadores são substâncias que sensibilizam neurônios periféricos, deixando-os mais responsivos inclusive a estímulos não-nocivos, causando um fenômeno conhecido por hipernocicepção (TEIXEIRA, 2009). Para minimizar a dor, são empregadas diversos fármacos, entre elas os antiinflamatórios, que agem bloqueando a ação da enzima ciclooxigenase. Entretanto, efeitos colaterais associados à essas drogas instigam a busca por alternativas menos prejudiciais para outros sistemas do corpo (SAKATA; ISSY; 2004b).

O estudo de produtos de origem animal ou vegetal que possam ser empregados na indústria farmacêutica é um campo que vem crescendo nos últimos 15 anos. A diversidade da fauna e flora ao redor do mundo estimula pesquisadores a buscar alternativas para os compostos já utilizados. Dentro dessa perspectiva, a variedade de insetos já descrita como sendo utilizada no tratamento de doenças diversas por comunidades tradicionais, induzem pesquisas para confirmação do uso popular destas substâncias (COSTA NETO, 2005).

Dinoponera quadriceps (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae) é uma formiga primitiva, endêmica da região nordeste do Brasil, cujo veneno possui propriedades antinociceptivas no tratamento de edema gerado por estímulos químicos (VASCONCELLOS et al., 2006; SOUSA et al., 2012). O gênero *Dinoponera* é empregado na medicina tradicional no tratamento de dor de ouvido (COSTA NETO, 2011), dor nas costas e reumatismo (COSTA NETO; RAMOS-ELORDUY; MORENO, 2006). Seu veneno apresenta constituição proteica e a atividade dessas moléculas parece ser o que confere ao veneno sua propriedade analgésica (SOUSA et al., 2012).

Deste modo, a ausência de trabalhos que investiguem o efeito do veneno frente a um estímulo traumático, seu uso popular estabelecido, assim como a busca por novas moléculas capazes de atuar como substitutas aos tratamentos atuais justificam a investigação, no

presente estudo, da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva como tratamento para úlceras cutâneas traumáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Úlceras cutâneas e cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano e a primeira barreira contra organismos invasores e outras ameaças do meio ambiente. A perda da integridade destas barreiras por meio de cortes ou úlceras pode levar o organismo a enfrentar graves problemas e até mesmo à morte (KONDO; ISHIDA, 2010).

Logo após a abertura da úlcera, seja por acidente ou como consequência de uma doença, dá-se início ao processo de cicatrização dessa ferida. A cicatrização é um processo complexo, embora muito bem orquestrado que envolve a organização celular, os sinais químicos e a participação de componentes da matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido danificado (SINGER; CLARK, 1999).

O tratamento de feridas tem por objetivos buscar o fechamento rápido da úlcera e deixar o tecido danificado com uma cicatriz esteticamente satisfatória e funcional (SINGER; CLARK, 1999), sendo grande importância para a medicina, para a economia e para o bem-estar de um paciente. Estima-se que o gasto anual por conta de problemas relacionados a feridas, nos Estados Unidos, seja de 1 bilhão de dólares (HUNT; HOPF; UENO, 2006).

O processo fisiológico que envolve a cicatrização de feridas é dividido em 4 fases que se sobrepõem no curso temporal: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação (Figura 1) (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Caso haja um retardo ou falha em alguma dessas etapas, a cicatrização pode ser prolongada, causando intenso desconforto para o paciente, podendo resultar em úlceras crônicas, cicatrizes esteticamente desagradáveis, ou mesmo no não fechamento da ferida (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

A primeira fase – homeostase – é estabelecida a partir da constrição de vasos danificados imediatamente após a abertura da úlcera, para evitar o sangramento excessivo. Os resultados dessa vasoconstrição são a hipóxia e a acidose tecidual. Essas condições favorecem a formação de óxido nítrico (NO), adenosina e outros metabólitos vasoativos, que, em conjunto com a histamina – liberada pelos mastócitos – promovem uma vasodilatação, permitindo que outros elementos celulares e plaquetas alcancem o local lesado (MEHTA; MALIK, 2006; HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, 2011).



Figura 1 - Processo clássico de cicatrização (modificado Enoch et al., 2009).

A primeira fase – homeostase – é estabelecida a partir da constrição de vasos danificados imediatamente após a abertura da úlcera, para evitar o sangramento excessivo. Os resultados dessa vasoconstrição são a hipóxia e a acidose tecidual. Essas condições favorecem a formação de óxido nítrico (NO), adenosina e outros metabólitos vasoativos, que, em conjunto com a histamina – liberada pelos mastócitos – promovem uma vasodilatação, permitindo que outros elementos celulares e plaquetas alcancem o local lesado (MEHTA; MALIK, 2006; HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, 2011).

As plaquetas, ativadas pela trombina, sofrem degranulação, liberando diversos mediadores – fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador alfa e beta (TGF- α e TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento vascular (VEGF) – (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000) e começam a aderir umas as outras e ao colágeno exposto pela injúria, formando um tampão plaquetário que temporariamente contera o sangramento (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Aliado a isso há a formação de um tampão de fibrina, oriundo da ativação da cascata de coagulação e do sistema complemento. Além do tampão, a cascata, a ativação do sistema complemento e a degranulação das plaquetas liberam mediadores vasoativos e substâncias quimiotáticas que

atuam no recrutamento de células inflamatórias – neutrófilos e macrófagos – para o local da ferida (CLARK, 1996).

Na fase inflamatória aguda ocorre um aumento da permeabilidade vascular o que causa a exsudação de plasma rico em proteínas para o tecido extravascular, causando edema. Nesse exsudato proteico encontramos neutrófilos, que alcançam rapidamente a úlcera – 1 hora após a injúria – e começam a eliminar patógenos e restos celulares destruídos como consequência da úlcera. Neutrófilos são capazes de: (1) realizar fagocitose; (2) sofrer degranulação e liberar uma variedade de substâncias tóxicas – proteases, catepsina e lactoferrina (HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, 2011; MEHTA; MALIK, 2006).

Macrófagos também alcançam rapidamente o local da ferida, atraídos por mensageiros químicos liberados por plaquetas e células danificadas, mas o seu pico de concentração é entre 48-72 horas após a injúria. Eles contêm um reservatório de fatores de crescimento, como TGF- β e EGF, ambos importantes na regulação da resposta inflamatória, no estímulo à formação de novos vasos – angiogênese – e no estímulo à formação do tecido de granulação (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Durante a fase aguda a inflamação também são produzidas pelos macrófagos ativados e neutrófilos as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que são poderosas moléculas oxidantes, tais como: NO, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), entre outros. Essas moléculas possuem função dupla e antagonista: ajudam a combater patógenos que invadem o sítio da úlcera durante a inflamação aguda, mas na inflamação crônica causam danos ao DNA, ocasionando mutações permanentes que podem levar até mesmo ao surgimento de tumores (FIALKOW et al., 2007; KHANSARI et al., 2009).

A fase inflamatória persistirá o tempo que for necessário, assegurando que o excesso de patógenos e de restos celulares seja removido da úlcera.

Seguinte à fase inflamatória, há a fase proliferativa, que consiste na recuperação do tecido lesado através da angiogênese, da formação do tecido de granulação, da deposição de colágeno, da re-epitelização e da retração da ferida. Todas estas etapas ocorrem simultaneamente (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

A partir das margens da lesão e com a liberação local contínua por macrófagos de fatores de crescimento, células epidérmicas infiltram o local da úlcera e começam a proliferar, iniciando o processo de re-epitelização e formação do tecido de granulação. Para manter esses dois eventos é necessário que exista uma rede de vasos que possam fornecer oxigênio e nutrientes para as células (SINGER; CLARK, 1999).

A angiogênese começa a partir do momento em que é formado o tampão homeostático. Em resposta à hipóxia, VEGF é liberado e, em conjunto com outras citocinas, estimula as células endoteliais a iniciar o processo de neovascularização e reparo dos vasos sanguíneos danificados (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Para garantir que os novos vasos se formarão no tecido em regeneração a partir de vasos pré-existentes, metaloproteinasas da matriz (MMPs) atuam na degradação da matriz extracelular existente danificada com a injúria (SIEFERT; SARKAR, 2012). As MMPs são secretadas por macrófagos, células da epiderme, células endoteliais e fibroblastos e também atuam na degradação do colágeno na etapa de remodelação (MIGNATTI et al., 1996). A produção de novos vasos a partir de vasos pré-existentes é também acompanhada por um aumento na permeabilidade vascular.

A formação do tecido de granulação precede a formação de uma nova matriz extracelular e é realizada pelos fibroblastos. Esse tecido começa a preencher o espaço da úlcera após, aproximadamente, 4 dias. Fibroblastos começam a proliferar estimulados por fatores de crescimento – principalmente TGF- β e PDGF – liberados pelo tampão hemostático. Entre o 2º e o 3º dia a ferida se torna rica em fibroblastos, que começam a produzir fibronectina, proteoglicanos, ácido hialurônico e colágeno – componentes da matriz extracelular. Gradualmente, o tampão vai sendo substituído por um tecido fibroso inflamado, róseo e vascularizado, composto principalmente de colágeno tipo 3, sendo chamado de tecido de granulação (ENOCH et al., 2008; HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, 2011).

A remodelação é a última fase do processo de cicatrização e pode se estender por longo período, chegando até a 2 anos para reorganização completa da arquitetura celular e maturação do tecido cicatricial (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Nessa etapa, fibroblastos já formaram matriz suficiente e se diferenciam em miofibroblastos, que conectam fibronectina ao colágeno, auxiliando na contração da úlcera. Os vasos formados no tecido de granulação, as células inflamatórias e os fibroblastos vão desaparecendo gradualmente por meio de apoptose, emigração ou outros mecanismos ainda não conhecidos de morte celular. Ao final desse processo, têm-se a formação de uma cicatriz paucicelular. Entretanto, se a população celular, especialmente a de fibroblastos, permanecer no local recuperado, pode haver a formação de cicatrizes hipertróficas e de queloides (ARNOLD; WEST, 1991; SINGER; CLARK, 1999).

2.2. Dor e nocicepção

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “experiência sensitiva e emocional decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais reais

ou potenciais”. Ela é uma experiência vivenciada por quase todos os seres humanos e constitui-se em um importante instrumento de proteção contra estímulos polimodais – mecânicos, químicos ou térmicos – nocivos, além de sensibilizar sistemas que protegem o indivíduo contra futuras lesões e estabelecer situações com limiares específicos e organizados (TEIXEIRA, 2009).

O primeiro passo que dá origem ao fenômeno sensitivo doloroso é a transformação de estímulos químicos (substâncias como bradicinina, prostaglandinas, capsaicina, entre outras), mecânicos (pressão) ou térmicos (calor ou frio) em potenciais de ação que serão transmitidos dos neurônios aferentes primários para as fibras nervosas do sistema nervoso periférico (SNP) e para o sistema nervoso central (SNC) e reconhecidos como nociceptivos quando excedem o limiar neuronal (TEIXEIRA, 2009).

Sherrington (1906) propôs a existência do nociceptor, hoje conhecido como uma terminação nervosa livre sem estruturas acessórias destinadas à transdução do estímulo, cuja ativação ocorre mediante a lesão de um tecido (BALDO, 2013). Dessa forma, o emprego do termo “nocicepção” é mais correto no que se refere ao reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, esquecendo-se um pouco a parte “perceptiva” ou “psicológica” (LOESER; MELZACK, 1999).

Nociceptores estão espalhados por todo o corpo, innervando pele, musculaturas, articulações e órgãos internos e são os primeiros na cadeia de neurônios responsáveis pela percepção da dor, sendo estimulados, principalmente, por lesões teciduais. Os corpos celulares dos nociceptores localizam-se nos gânglios da raiz dorsal, próximos à medula espinhal, ou no gânglio trigeminal para inervação da face. Eles transmitem impulsos da periferia para o corno dorsal da medula espinhal, onde a informação é processada através de circuito sináptico e transmitida a diversas partes do cérebro (MESSLINGER, 1997; BALDO, 2013). Os nociceptores que recebem o estímulo e transmitem a informação ao cérebro são denominados neurônios aferentes, que são classificados em três grupos, de acordo com a dimensão do corpo celular e seus axônios (TEIXEIRA, 2009):

- a. Fibras C – de pequeno diâmetro, amielinizadas, com velocidade de condução entre 0,4-1,4 m/s e com alto limiar de ativação, detectando seletivamente estímulos nociceptivos;

- b. Fibras A- δ – de médio diâmetro, levemente mielinizadas, com velocidade de condução entre 25-50 m/s e limiar mais elevado de ativação;
- c. Fibras A- α e A- β – de grande diâmetro, altamente mielinizadas, com velocidade de condução elevada e baixo limite de ativação.

Segundo Teixeira (2009) as fibras A- α e A- β transmitem informações referentes a estímulos não-nocivos, relacionados a receptores táteis como os de Merkel, os corpúsculos de Meissner e os folículos pilosos. Os estímulos nociceptivos são veiculados após uma lesão tecidual, sensibilização dos mecanorreceptores por substâncias inflamatórias ou alterações na osmolaridade. As fibras A- δ respondem a estímulos mecânicos intensos e medeiam a dor primária, descrita como uma picada e sendo bem delineada e rapidamente induzida. Ainda segundo Teixeira (2009) as fibras C, por sua vez, respondem aos estímulos mecânicos, térmicos e químicos – sendo chamados de nociceptores polimodais – e são responsáveis por mediar a dor secundária ou alentecida, descrita como um sensação difusa.

Quando provocada pelo processo inflamatório, a dor é resultante da ação de mediadores inflamatórios específicos, advindos do tecido danificado, nos neurônios sensoriais nociceptivos periféricos. Tais mediadores podem sensibilizar esses nociceptores e também podem desencadear eles próprios a resposta dolorosa (CASTRO, 2011).

A dor é percebida no córtex e no tálamo, as regiões finais das vias de nocicepção, sendo que o tálamo funciona como um ponto de redistribuição e o córtex participa da discriminação e localização do estímulo (MILLAN, 1999; 2002). O início dessa transmissão ascendente da nocicepção se dá no corno central da medula espinhal, local onde os terminais centrais de fibras aferentes terminam. O corno dorsal é organizado em lâminas, chamadas lâminas de Rexed. As fibras A- δ terminam nas lâminas I e V, enquanto as fibras C terminam nas lâminas II e III (Figura 2) (D'MELLO; DICKENSON, 2008). No corno dorsal, os nociceptores criam conexões sinápticas com interneurônios e neurônios de segunda ordem (ou secundários) através de neurotransmissores como o glutamato e a substância P (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os neurônios secundários seguem o seu trajeto nas áreas laterais da medula espinhal e projetam-se ascendentemente para o tálamo que possui células que se projetam para o córtex somatossensorial do lobo parietal e para outras áreas do córtex. A projeção desses neurônios a partir do corno dorsal e ascendendo ao córtex e ao tálamo forma os tratos que constituem as vias ascendentes de condução da dor: trato neoespinotalâmico, paleoespinotalâmico e espinomesencefálico (SOUSA, 2013). Além das vias ascendentes responsáveis pela transmissão da dor, existem vias descendentes relacionadas com a modulação da dor. Essas

vias se originam em vários níveis do encéfalo, nos tronco encefálico, hipotálamo, córtex e tálamo (MILLAN, 2002).

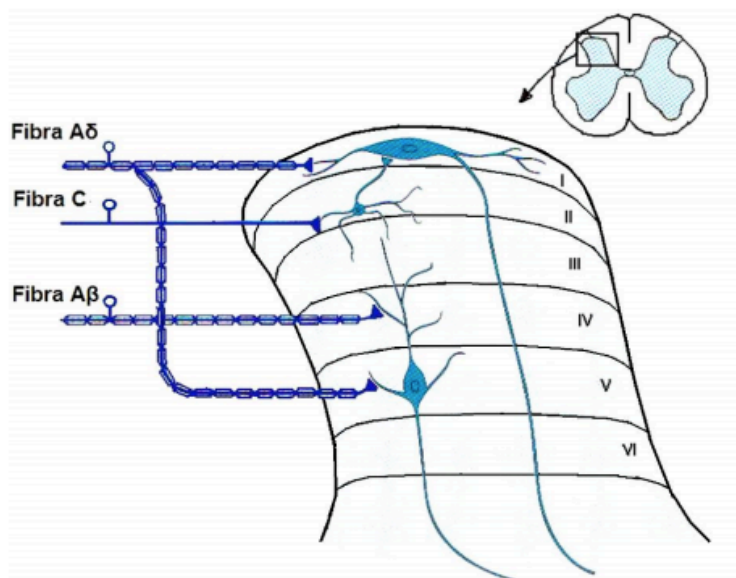


Figura 2 - Inserção das fibras nervosas aferentes no corno dorsal da medula espinal (lâminas de Rexed) (adaptado de Nestler et al., 2001).

Os mediadores químicos envolvidos no estímulo ao nociceptor são diversos e muitos também estão implicados no processo inflamatório agudo, tais como NO, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1-beta (IL-1 β), bradicinina, prostaglandinas (SAKATA; ISSY, 2004a).

A dor inflamatória é mediada por muitos desses mediadores envolvidos no estímulo ao nociceptor. Eles são capazes de sensibilizar os nociceptores ou, também, desencadear a própria resposta dolorosa. Eles desencadeiam modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos, permitindo o surgimento da hiperalgesia inflamatória (HARDY et al., 1950). Esses mediadores são divididos em 2 grupos: hiperalgésicos intermediários e hiperalgésicos finais.

Os mediadores hiperalgésicos intermediários (TNF-alfa; IL-1; IL-8; bradicinina) são liberados no início e durante a inflamação e são responsáveis pela liberação de outros mediadores do processo. Por outro lado, os mediadores hiperalgésicos finais (prostaglandinas, prostaciclina) são os que interagem diretamente com receptores específicos presentes na membrana do nociceptor e modificam as vias de sinalização intra celular (via segundos mensageiros como: adenosina monofosfato cíclico – AMPc – e as proteínas quinases A –

PKA – e C – PKC), levando a célula nervosa a modificar o seu limiar de ativação, tornando-a mais facilmente excitável (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; ALEY et al., 2000). Os mediadores intermediários e finais vão ativar as vias de sinalização intracelular neuronais, através de segundos mensageiros que atuam na modulação da atividade de canais iônicos, iniciando os mecanismos periféricos neuronais da dor inflamatória, responsáveis por manter o indivíduo em um estado de hipernocicepção (COUTAUX et al., 2005; FERREIRA et al., 2009).

2.3. Terapias atuais no tratamento da dor

A dor pode ser tratada por diversos meios que busquem aliviar o desconforto de um indivíduo. Esses meios podem ser farmacológicos ou não-farmacológicos, incluindo-se tratamentos cirúrgicos, anestesiológicos, reabilitações, terapias educativas, psicoemocionais e comportamentais (FERREIRA; TEIXEIRA, 2009), visto que a dor é uma experiência multidimensional e apresenta componentes psicológicos que, por vezes, fogem ao escopo da terapia com fármacos.

O tratamento farmacológico da dor deve seguir orientações e diretrizes propostas por sociedades, entidades de acreditação, organizações, entre outros (FERREIRA; TEIXEIRA, 2009). Apesar da medicina ter avançado na busca de terapias alternativas ao uso de fármacos, a sua administração ainda é o principal caminho para o tratamento da dor, seja ela aguda ou crônica (OLIVEIRA, 2009).

No tratamento farmacológico da dor são utilizadas drogas analgésicas, medicamentos que alteram a sensibilidade do nociceptor ao estímulo e as respostas reflexas associadas ao estímulo nociceptivo (Tabela 1).

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento da dor (adaptada de Oliveira, 2009)

Farmacologia da dor
1. Analgésicos
a. Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES)
b. Opioides
2. Relaxantes musculares
3. Ansiolíticos
4. Anticonvulsivantes
5. Antidepressivos
6. Anti-reumáticos
7. Corticoides
8. Antipsicóticos
9. Anti-serotoninérgicos
10. Anestésicos locais
11. Outros

2.3.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES)

Dentre os fármacos aplicados na terapia para dor, a classe mais utilizada é a de AINES – anti-inflamatórios não-esteroidais –, sendo caracterizados pelas propriedades analgésica e anti-inflamatória moderada, antipirética, antitrombótica e de irritação e erosão gástrica (OLIVEIRA, 2009).

O mecanismo de ação dessas drogas é caracterizado pelo bloqueio da ação da ciclooxigenase (COX), uma enzima que atua na síntese de prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico (Figura 3)(BOTTING, 2006). As prostaglandinas, como já discutido, são importantes mediadores químicos da hipernocicepção na fase inflamatória de uma lesão (LEES, 2003).

Existem duas isoformas bastante conhecidas da enzima ciclooxigenase: COX-1, dita constitutiva e encontrada em quase todas as células, à exceção do eritrócito, e COX-2, dita indutiva por ter sua expressão ligada ao estímulo inflamatório em células migratórias e nos tecidos lesados. Essas enzimas desempenham papéis fisiológicos distintos e são codificadas por genes diferentes (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006). Uma terceira isoforma, COX-3, foi descrita recentemente (OLIVEIRA, 2009).

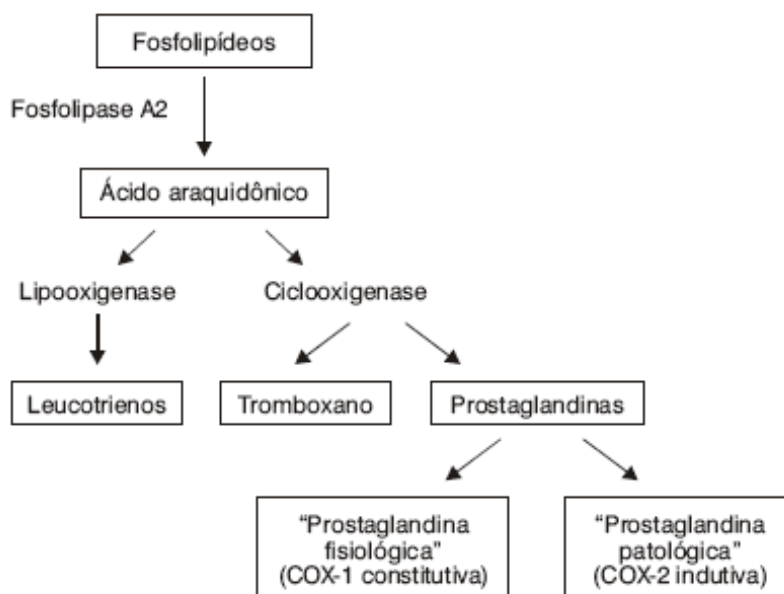


Figura 3 - Síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico (adaptado de Hilário et al., 2006).

A enzima COX-1 é a mais envolvida em ações fisiológicas tais como: proteção gástrica – pela produção do muco gástrico e inibição da secreção ácida gástrica –, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo renal. Fármacos que inibem essa isoforma são responsáveis por causar lesões gástricas, inibição da coagulação e nefrotoxicidade como efeitos colaterais (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Já a COX-2 é expressa principalmente face a um estímulo inflamatório e tem ação mais direta durante o processo de inflamação: sua expressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias – IL-1, IL-2, TNF α – e isso faz com que PG sintetizadas via COX-2 – principalmente PGE₂ – atuem aumentando a vasodilatação de arteríolas na área lesionada, a permeabilidade vascular e potencializem as ações de vários mediadores envolvidos na hipernocicepção local, estimulando ainda mais os nociceptores (FAIRWEATHER et al., 2015; LEES, 2003).

Os efeitos colaterais mais comuns relacionados a essas drogas são os que afetam os sistemas gastrointestinal, renal, hematológico e hepático. As PG possuem efeito citoprotetor e quando sua produção é inibida, têm-se a ocorrência de lesões gastrointestinais – úlceras, erosão, hemorragia, perfuração gástrica e duodenal. Já no sistema renal, os efeitos deletérios são observados na manutenção da perfusão e filtração glomerular: as PG desempenham importante papel na função renal, no fluxo sanguíneo renal, na filtração glomerular, na liberação de renina, no transporte de íons e na troca de água. Nesse contexto, a administração

de anti-inflamatórios diminui o fluxo sanguíneo renal e provoca retenção de sódio (SAKATA; ISSY, 2004b).

Os AINES podem atuar bloqueando ambas as ciclooxygenases ou serem seletivos para COX-2, o que diminui os efeitos colaterais deletérios ao sistema gastrointestinal e renal (FARQUHAR-SMITH, 2008).

2.4. Produtos naturais: alternativa possível

A variedade de espécies fornece uma gama de produtos naturais que o homem vem utilizando desde os primórdios da humanidade para tratar diversos sintomas.

Dentre os grupos de animais com maior potencial de obtenção de novas substâncias estão os insetos. Utilizados em infusões, macerados, cozidos, em emplastos e pomadas, esses animais estão presentes na medicina praticada por comunidades tradicionais em diversas culturas (COSTA-NETO, 2005; SAJEM BETLU, 2013).

Inúmeros insetos e suas substâncias já são reconhecidos popularmente como agentes terapêuticos, especialmente aqueles da ordem Hymenoptera, que compreende abelhas, vespas e formigas (COSTA NETO, 2011). Isso vem despertando o interesse de pesquisadores ao redor do mundo e estudos já apontam para a validação científica no que concerne ao uso desses produtos (MERLO et al., 2011; MORTARI et al., 2007; SON et al., 2007).

O uso de venenos de vespa e abelha no tratamento da dor vem sendo estudado há pelo menos 15 anos (LEE et al., 2001; MORTARI et al., 2007). Entretanto, não há um significativo número de trabalhos comprovando o já estabelecido uso popular de veneno de formigas no combate à dor, mesmo sendo estas organismos bastante relacionados com os já previamente mencionados (SOUSA et al., 2012).

2.5. *Dinoponera quadriceps* e seu veneno

Formigas (Formicidae) são um grupo parte da ordem Hymenoptera, junto com outras famílias importantes de insetos, como Apidae (abelhas) e Vespidae (vespas) (GULLAN; CRANSTON, 2010). Como uma das famílias mais bem descritas da atualidade, as formigas são organismos que vivem em colônias com dezenas, centenas ou milhares de outros indivíduos, sendo considerados insetos sociais e que apresentam uma hierarquia de trabalho, onde as operárias sustentam as rainhas, que são, por sua vez, os organismos capazes de reproduzir (WILSON, 1971).

A subfamília Ponerinae é caracterizada pela ausência de rainhas em suas pequenas colônias e por seu hábito forrageador solitário (PEETERS, 1997; PEETERS; ITO, 2001).

Dentro desta subfamília está o gênero *Dinoponera*, com seis espécies conhecidas (KEMPF, 1971). Elas estão presentes na fauna de países tropicais e são consideradas formigas-gigantes, com seu tamanho variando de 3-4 cm. Como outros grupos dentro da subfamília Ponerinae, as formigas do gênero *Dinoponera* são predadoras que se alimentam de outros insetos de porte médio ou grande. Elas dominam suas presas por meio da sua ferroada que libera veneno (ARAÚJO; RODRIGUES, 2006).

Dinoponera quadriceps apresenta uma distribuição geográfica muito restrita, sendo encontrada, basicamente, no nordeste do Brasil, em diversos tipos de vegetação – caatinga, cerrado, brejos de altitude (VASCONCELLOS et al., 2006).

O veneno de *D. quadriceps* (DqV) ainda tem seus efeitos relativamente desconhecidos. Ele é produzido na glândula de veneno, dentro dos túbulos secretores e da glândula convoluta, e armazenado em um reservatório (MATHIAS, 2007). A picada da formiga e a injeção do veneno na pele causam uma reação inflamatória clássica, apresentando os 4 sinais cardinais (rubor, calor, dor e edema), tendo portanto uma ação pró-inflamatória quando administrado por via local, como apresentado no trabalho de Sousa et al. (2012). Seu veneno é principalmente proteico – 64,4% de proteínas – e testes comportamentais *in vivo* para avaliar a nocicepção já demonstraram que ele apresenta efeito antinociceptivo (SOUSA et al., 2012). O componente proteico parece ser o responsável pelo efeito antinociceptivo visto que, em aplicações do veneno após este passar por aquecimento a 100°C, sua atividade analgésica foi abolida. Além disso, o veneno não apresenta toxicidade a nível celular, como demonstrado por meio de cultura de macrófagos RAW 264.7 (SOUSA, 2013). Outros efeitos já constatados são: antimicrobiano (LIMA et al., 2014), pro e anticonvulsivante (NOGA et al., 2015), neuroprotetor (via intraperitoneal), neurotóxico (via endovenosa) (LOPES et al., 2013), anti-inflamatório, anticoagulante e antiplaquetário (MADEIRA et al., 2015).

Os achados acerca da atuação do veneno na diminuição da dor levam à ideia de que mediadores inflamatórios estejam sendo regulados por ação deste e que seu efeito pró-inflamatório seja ligado à via de aplicação. Sustentada, ainda, por relatos de usos por comunidades tradicionais no tratamento de dores diversas (COSTA-NETO, 2005), a investigação das propriedades desse veneno se configura em algo de importância considerável na busca por alternativas à terapêutica atual.

2.6. Objetivos do estudo

Avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do veneno de *Dinoponera quadriceps* em úlceras cutâneas traumáticas em camundongos.

Objetivos específicos:

a) Avaliar o efeito do veneno em um modelo comportamental de nocicepção em úlceras cutâneas traumáticas;

b) Avaliar o efeito do veneno sob a imunoexpressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e parâmetros inflamatórios agudos em úlceras cutâneas traumáticas.

3 METODOLOGIA

3.1. Coleta e manutenção de *Dinoponera quadriceps*

Colônias de *D. quadriceps* – indivíduos adultos e prole – foram coletadas na serra de Maranguape-CE e levadas ao Laboratório de Entomologia - Unidade Mimercolgia (LABENT) na Universidade Estadual do Ceará (UECE), em recipientes separados para cada ninho escavado. No LABENT, cada ninho foi mantido em uma caixa de plástico (63 cm x 42 cm e 12 cm de altura), com temperatura estável de 30 ± 2 °C e submetido a um ciclo 12/12 h de luz/escuro. Em cada caixa, vários tubos de PVC (4 cm de diâmetro, 38 cm de comprimento) de cor preta e fechados em uma das extremidades serviam como locais de nidificação (Figura 3). As formigas foram alimentadas *ad libitum* com porções de atum comercial e larvas de *Tenebrio molitor*. Todas as coletas e o transporte de formigas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/SISBIO (autorização n ° 28794-1 - em anexo).



Figura 4 - Ninho de *D. quadriceps* (foto por Beatriz Adjafre)

3.2. Extração do veneno

Cada ninho (total = 4) foi submetido regularmente (a cada duas semanas) ao processo de extração do veneno contido na glândula de veneno da formiga, durante 2 meses. Esse processo consistia na contenção física da formiga, na região do tórax, com uma pinça entomológica flexível, seguida pela introdução do ferrão da formiga em um tubo capilar contendo tampão acetato de amônia (10mM, ph 6.8), para induzir a secreção de veneno (Figura 4). Uma vez o capilar preenchido por veneno, este foi coletado com pipeta de 10 μ L e armazenado em tubos Eppendorf®, mantidos em gelo. Em seguida, DqV foi liofilizado e conservado em freezer - 20 °C para posterior uso no tratamento das úlceras cutâneas.



Figura 5 - Extração do veneno de *D. quadriceps* (cortesia do Dr. Yves Quinet)

3.3. Animais de experimentação

Camundongos Swiss albinos fêmeas (n=72), pesando entre 20 e 35 g, foram obtidos do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos na sala de quarentena do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), a 26 ± 2 °C com um ciclo 12/12 h de luz/escuro, recebendo água e ração *ad libitum*, nos dias antecedentes ao experimento. Esses animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de, pelo menos, uma hora antes dos testes e foram manipulados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UECE (CEUA-Nº 1776865-2015 - em anexo).

3.4. Úlcera cutânea

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina 10% (1,25mL/kg) e xilazina 2% (0,652mL/kg) diluídas em solução salina estéril (0,9% NaCl). Na região dorsal de cada camundongo foram feitas 2 úlceras cutâneas com um *punch* cirúrgico de 8mm de diâmetro. Após a ulceração, os animais foram colocados em caixas individuais com ração e água *ad libitum* para recuperação de 24 horas e posterior tratamento das feridas durante 4 dias.

3.5. Grupos de tratamento

Os animais foram separados em 3 grupos. Cada animal recebeu tratamento diário, 1 vez por dia, durante 4 dias, de acordo com a tabela 2. Após cada aplicação, nos tempos pré-estabelecidos de 0.5, 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, foi realizado o teste de Von Frey.

Tabela 2 - Esquema de tratamento dos camundongos

Grupo	Número de animais	Tratamento
Salina	24	NaCl (0,9%); 50 µL/10 g de peso corporal; via e.v.
Celecoxib	24	Celebra® diluído em NaCl 0,9%; 30 mg/kg; via i.p.
DqV	24	Veneno de <i>D. quadriceps</i> diluído em NaCl 0,9%; 50 µL/ 10 g de peso corporal; via endovenosa (e.v.)

3.6. Teste dos filamentos de Von Frey

Cada grupo recebeu seu tratamento 30 minutos antes da primeira avaliação diária de nocicepção pelos filamentos de Von Frey: o teste consistiu em aplicar pressão mecânica na área imediatamente ao lado da área ulcerada. Esse estímulo era aplicado até que o animal respondesse – movimento de fuga, guincho, ataque ao filamento. O valor mostrado no transdutor de pressão era, então, anotado e mais duas medições eram feitas. A média das três medições foi considerada uma unidade amostral de um animal. Esse procedimento foi repetido em todos os animais, em tempos pré-estabelecidos de 30 minutos, 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas, totalizando 4 dias.

Os dados foram expressos como Média e Erro Padrão da Média (E.P.M.) das unidades amostrais de cada tempo, para grupo de tratamento.

3.7. Extração da úlcera

Em cada um dos tempos pré-estabelecidos foram eutanasiados 3 animais por grupo, por meio de deslocamento cervical. As úlceras foram retiradas em seguida com bisturi e tesoura cirúrgica. Seguindo a metodologia, as úlceras foram depositadas em um cassete histológico e embebida em formol 10% para conservação em temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 horas, quando foram colocadas em álcool 70%, permanecendo nessa solução até a elaboração da lâmina histológica.

3.7.1 Análise histológica

Após o período de fixação, os fragmentos foram analisados macroscopicamente e submetidos à desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação em parafina fundida a 60°C e inclusão dos fragmentos na mesma, formando blocos à temperatura ambiente. Estes foram seccionados com $5\ \mu\text{m}$ de espessura, utilizando o micrótomo. As lâminas histológicas foram confeccionadas utilizando-se a coloração de rotina pela hematoxilina-eosina e a análise histopatológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico, onde foram observadas e descritas as características histológicas de cada fase de cicatrização. Para a análise histopatológica foram adotados escores para comparação dos estágios da fase da úlcera (modificado de Cavalcante, et al (2011):

0. Sem úlcera / Inflamação inexistente.
1. Com úlcera /Infiltrado inflamatório leve.
2. Com úlcera / Fibrose + moderada inflamação crônica.
3. Com úlcera / Processo inflamatório agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto).

Uma lâmina resultante da úlcera de cada animal foi analisada e categorizada de acordo com os escores pré-estabelecidos.

Os dados foram expressos como Mediana dos escores, Mínimo e Máximo para cada grupo de tratamento.

3.7.2. Avaliação do infiltrado de polimorfonucleares em lâminas histológicas

Para a quantificação do infiltrado de polimorfonucleares, as lâminas coradas em HE foram observadas no aumento de 1000x, tendo sido selecionados 8 campos por lâmina, em áreas próximas a úlcera e que apresentavam grande densidade celular, nos tempos de 0.5, 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Dentro de cada campo foram contados células PMN (células de núcleo segmentado e morfologia multilobulada) (adaptado de LIU et al., 2006), sendo

considerada uma unidade amostral de cada animal o somatório dos 8 campos por lâmina (adaptado de ANDRADE et al., 2011).

Esse protocolo foi aplicado em 3 lâminas para cada tempo avaliado do curso temporal da úlcera, em cada um dos grupos experimentais (salina, celecoxib e DqV), sendo o resultado final expresso como Média e E.P.M. das unidades amostrais.

3.7.3. Análise imunohistoquímica de TNF- α em lâminas histológicas

Para avaliação da presença de TNF- α , as lâminas foram submetidas à marcação com anticorpo anti-TNF- α . Inicialmente, essas foram aquecidas à 60°C durante 3 horas em estufa e submetidas, sequencialmente, a banhos em xilol (temperatura ambiente) e em álcool 100% e 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente e água destilada, para serem incubadas com tampão citrato pH 6.0 e aquecidas no microondas em potência média durante 15 minutos. Após o aquecimento, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas durante 15 minutos com tampão fosfato-salino (PBS). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% em 2 banhos de 15 minutos cada. Após essa etapa foi realizada a incubação com o anticorpo anti-TNF- α (diluição 1:125), por, aproximadamente, 16 horas em ambiente refrigerado.

No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS em 3 lavagens de 5 minutos cada e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário Histofine[®] (IgG anti-goat acoplado a uma peroxidase) por 30 minutos (diluição 1:200). Na etapa seguinte, foram lavadas com PBS e o DAB foi aplicado 3 minutos. Após lavagem, a contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer e as lâminas foram, então, montadas.

A análise das lâminas se deu no microscópio óptico no aumento de 1000x e fotomicrografias foram tiradas no microscópio Leica DM2500 & DM2500 LED com câmera Leica DMC2900 acoplada. Para a análise foram adotados escores que reflitam a quantidade de células imunomarcadas com anti-TNF- α , de acordo com TUXHORN, et al. (2002):

0. Sem marcação positiva;
1. Marcação leve – 1 a 33% de células marcadas;
2. Marcação moderada – 34 a 66% de células marcadas;
3. Marcação intensa – >66% de células marcadas.

Os tempos 0.5, 24 e 48 horas foram avaliados em cada grupo experimental (salina, celecoxib, DqV). Para cada tempo de um grupo foram analisadas 3 lâminas. Em cada lâmina foram observados 2 campos imediatamente abaixo da área de úlcera e foram consideradas

marcadas as células inflamatórias e células do tecido conjuntivo que apresentassem núcleo e/ou citoplasma com coloração acastanhada.

Os dados obtidos foram expressos como Mediana dos escores, Mínimo e Máximo, para cada tempo avaliado em todos os grupos experimentais.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA/Bonfferoni).

Para comparação múltipla dos resultados histopatológicos e imunohistoquímicos os resultados foram expressos como Mediana (máxima e mínima) e foi utilizado o teste de Dunnet.

Em todas as análises estatísticas considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism[®] 6.0.

4 RESULTADOS

4.1. DqV diminui a hipernociceção no teste dos filamentos de Von Frey em úlceras cutâneas traumáticas em camundongos

No curso temporal de 5 dias (representado aqui em horas), verificou-se uma diminuição na resposta hipernociceptiva para os animais tratados com DqV (50 µg/kg; e.v.) e para os tratados com Celecoxib (30 mg/kg; i.p.) em relação ao controle negativo – salina (50 µL para cada 10 g de peso corporal; i.p.) (Figura 6).

Respostas ao estímulo hipernociceptivo dos animais tratados com DqV nos tempos 0.5 h (277,6 ± 21,9 g vs. salina: 61,7 ± 11 g); 1 h (269,9 ± 23,7 g vs. salina: 71,2 ± 13,3 g); 6 h (285,8 ± 17,4 g vs. salina: 107 ± 17,9 g); 12 h (285,9 ± 49,2 g vs. salina: 55,6 ± 15,2 g); 24 h (317,5 ± 37,4 g vs. salina: 63,2 ± 20 g); e 48 h (325,65 ± 16 g vs. salina: 77 ± 22,4 g) foram significativamente menores que nos animais do grupo salina.

Ainda constata-se diferença significativa entre DqV e Celecoxib (277,6 ± 21,9 g vs. 119,5 ± 26,7 g; 269,9 ± 23,7 g vs. 152,44 ± 33 g) nos tempos 0.5 e 1 hora, respectivamente. Também observa-se diferença estatística entre celecoxib e salina nos tempos 6 h (224, 25 ± 43,4 g vs. 107 ± 17,9 g); 24 h (200 ± 34 g vs. 63,2 ± 20 g); e 48 h (229,6 ± 35,5 g vs. 77 ± 22,4 g).

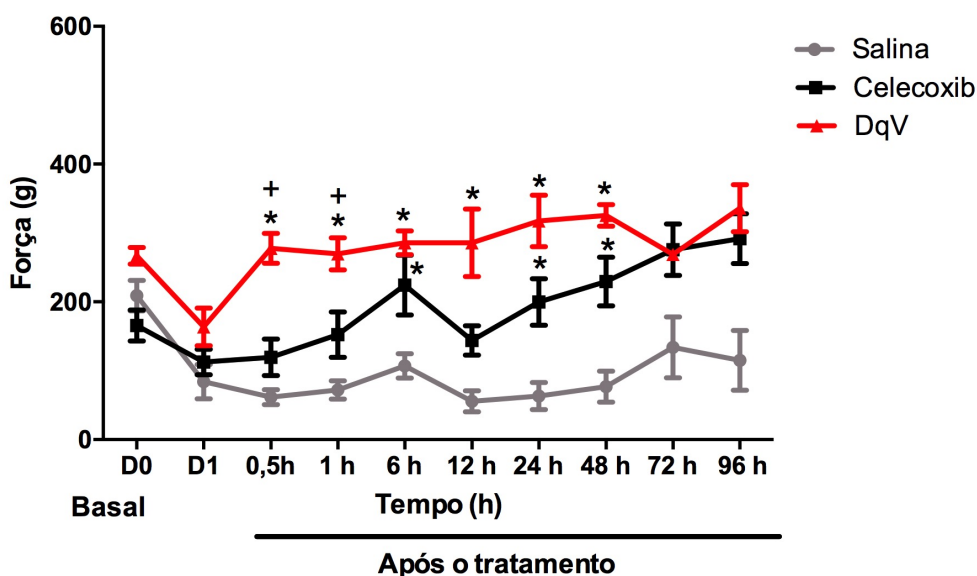


Figura 6 - Avaliação da hipernociceção (Von Frey) em úlceras cutâneas traumáticas em animais tratados com DqV, celecoxib ou salina. Os 3 grupos foram tratados diariamente, durante 4 dias e avaliados em todos os tempos descritos através do teste de Von Frey. Resultados expressos em Média ± E.P.M. (n=5). *p<0,05 em relação à salina. +p<0,05 em relação ao celecoxib (2way-ANOVA e teste de Bonferroni).

4.2. A análise histológica do grupo DqV não mostra redução de escores inflamatórios, em úlceras cutâneas, com relação ao grupo controle

A análise histológica foi baseada em critérios previamente estabelecidos e as imagens analisadas microscopicamente não revelam diferenças significativas entre os grupos estudados.

Em todos os tempos analisados os padrões inflamatórios das amostras de todos os grupos se apresentam de maneira semelhante, com abundante presença de células inflamatórias (PMN) e também a presença de hemorragia e ectasia de vasos, sendo atribuído escores 3 (3,3) para todos os grupos, com celecoxib e salina variando o valor do Mínimo no tempo 48 horas – escore 3 (2,3) (Figura 8 e Tabela 3).

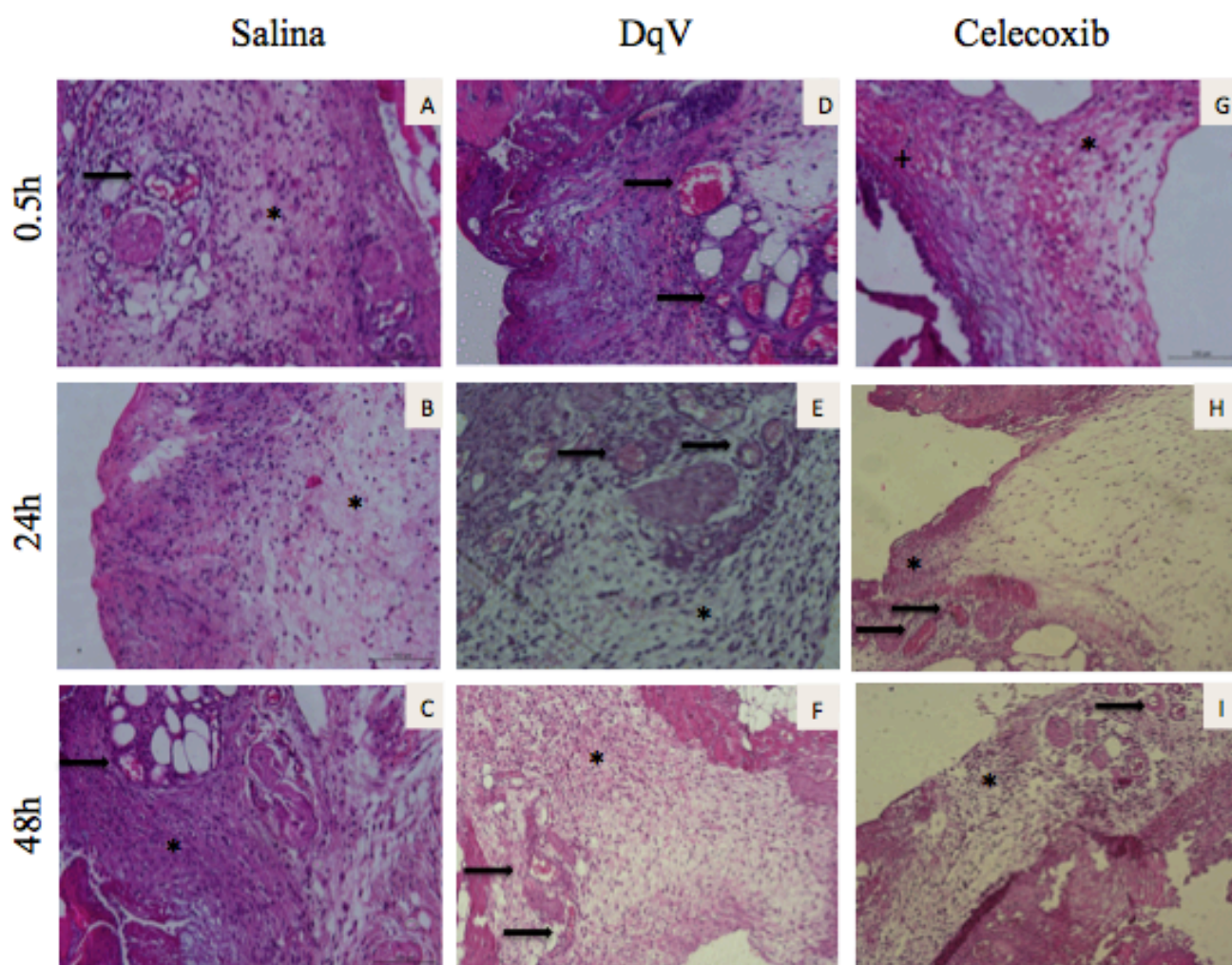


Figura 7 - Fotomicrografias do tecido conjuntivo abaixo da área de úlcera em pele de camundongos. Animais tratados com salina (A-C), com DqV (D-F) e com celecoxib (G-I), 0,5, 24 e 48 horas após tratamento. Setas indicam ectasia de vasos, asteriscos marcam o tecido conjuntivo e cruzes marcam áreas de hemorragia. Coloração hematoxilina-eosina e aumento de 200x.

Tabela 3 - Avaliação de escores histológicos inflamatórios de úlceras cutâneas traumáticas em camundongos tratados com salina, celecoxib e DqV

	0.5 h	24 h	48 h
Salina	3 (3,3)	3 (3,3)	3 (2,3)
Celecoxib	3 (3,3)	3 (3,3)	3 (2,3)
DqV	3 (3,3)	3 (3,3)	3 (3,3)
P-valor	-	-	0.6297

Gradação: 0) Sem úlcera/inflamação inexistente; 1) Com úlcera/Infiltrado inflamatório leve; 2) Com úlcera/Fibrose com moderada inflamação crônica; 3) Com úlcera/Processo inflamatório agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto). Mediana; Mínima, Máxima (n= 3) *p< 0,05 em relação ao grupo salina (1way-ANOVA e teste de Dunnet).

4.3. DqV diminui a presença de células polimorfonucleares no infiltrado celular de úlceras cutâneas traumáticas em camundongos

O grupo DqV apresentou menor número de células polimorfonucleares (PMN) no infiltrado em quase todo o curso temporal, entretanto apenas os tempos 0,5 ($31 \pm 8,66$ PMN) e 6 horas ($30 \pm 9,16$ PMN) mostraram diferença significativa em relação ao grupo salina (0,5 h: $88 \pm 9,07$ PMN; 6 h: $84,33 \pm 20,57$ PMN) (Figura 7).

Ainda é possível observar uma diminuição significativa na contagem de PMN no grupo DqV em relação ao grupo celecoxib na 6^a hora ($30 \pm 9,16$ PMN vs. 70 ± 5 PMN) e nos animais tratados com celecoxib na 96^a hora em relação ao grupo salina ($26,7 \pm 2$ PMN vs. $63 \pm 9,3$ PMN).

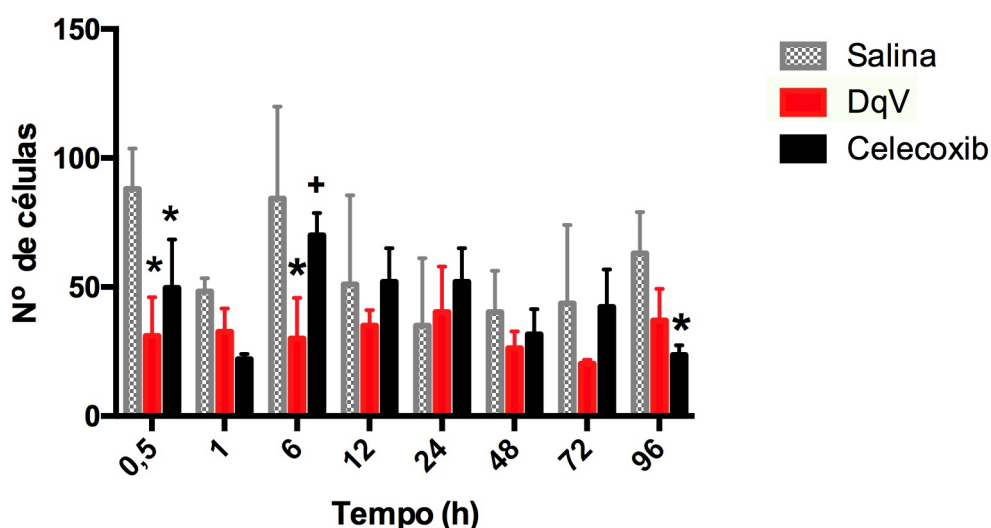


Figura 8 - Contagem histológica de células polimorfonucleares em úlceras cutâneas traumáticas em camundongos tratados com DqV, celecoxib ou salina. As contagens foram feitas no aumento de 1000x. Para cada tempo de cada grupo foram analisadas 3 lâminas (1 por animal), sendo analisados 8 campos em cada lâmina. O somatório dos 8 campos foi considerado 1 unidade amostral. Os resultados são apresentados como média e erro-padrão da média. *p<0,05 em relação à salina. +p<0,05 em relação ao DqV (2way-ANOVA e teste de Bonferroni).

4.4. A análise imunohistoquímica de úlceras cutâneas do grupo DqV não indica redução na expressão de TNF- α em úlceras cutâneas com relação aos grupos controle

As fotomicrografias analisadas no ensaio de imunohistoquímica não mostram diferença significativa na expressão de TNF- α em tecidos tratados com DqV, em relação à salina e ao celecoxib.

Pela análise das imagens, nenhum dos tempos avaliados apresentou diferença, entre os grupos experimentais, na Mediana dos escores do percentual de células marcadas.

A Mediana para todos os tempos considerados e em todos os grupos de tratamento foi 3, mostrando elevada marcação para TNF- α em células inflamatórias e do conjuntivo, superior a 66% (Tabela 4 e Figura 9).

Tabela 4 – Avaliação de escores imunohistoquímicos para expressão de anti-TNF- α em úlceras cutâneas traumáticas de camundongos tratados com salina, celecoxib e DqV

	0.5 h	24 h	48 h
Salina	3 (3,3)	3 (3,3)	3 (3,3)
Celecoxib	3 (2,3)	3 (3,3)	3 (3,3)
DqV	3 (3,3)	3 (3,3)	3 (3,3)
P-valor	0.4219	-	-

Gradação: 0 – sem células marcadas; 1) 1-33% de células marcadas; 2) 34-66% de células marcadas; 3) 67-100% de células marcadas. Mediana; Mínima-máxima (n=3-5) *p<0,05 em relação ao grupo salina (Dunnet).

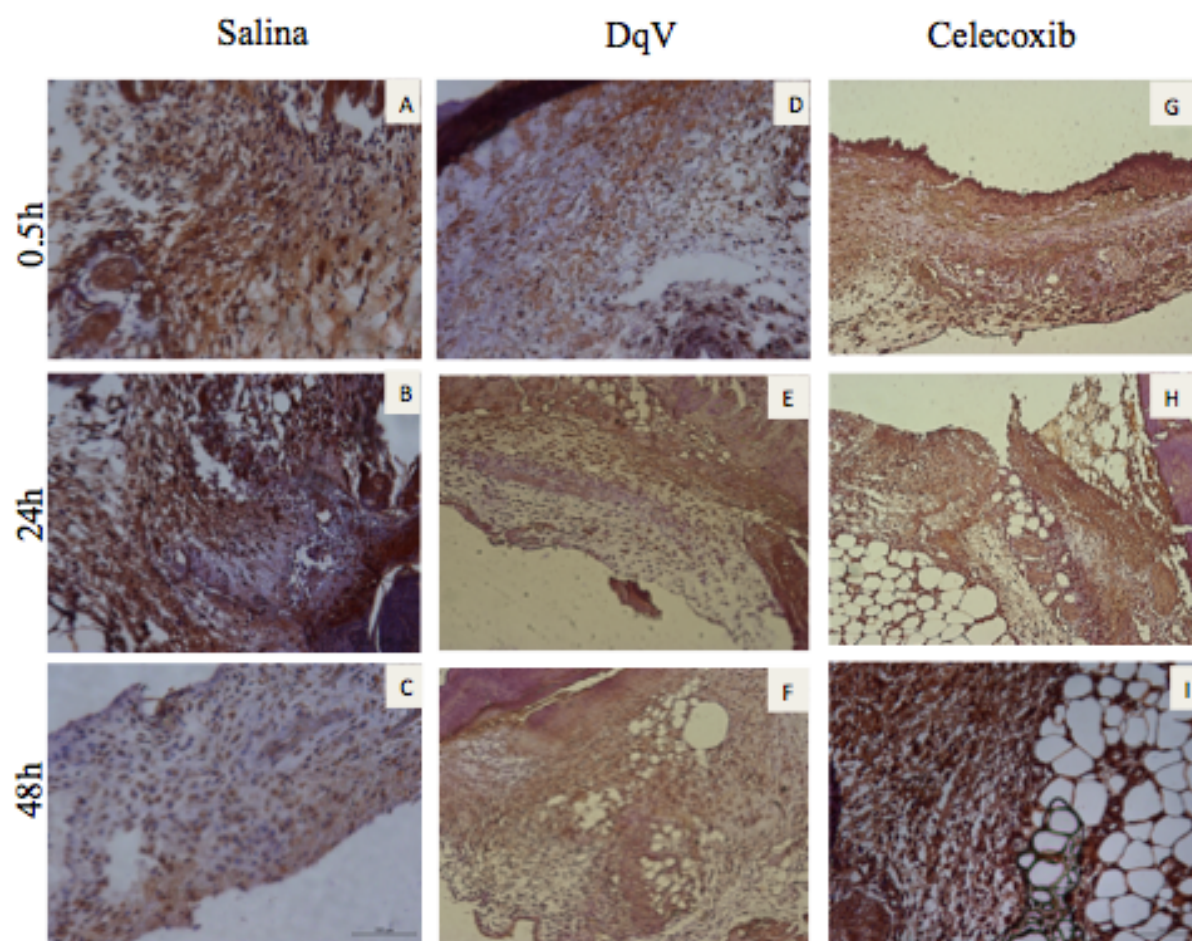


Figura 9 - Fotomicrografias das áreas de úlcera marcadas com anticorpo anti-TNF- α em pele de camundongos. Animais tratados com salina (A-C), com DqV (D-F) e com celecoxib (G-I), 0,5, 24 e 48 horas após tratamento evidenciando elevado percentual de células (inflamatórias e do tecido conjuntivo) marcadas para anti-TNF- α . Marcação imunohistoquímica com anti-TNF- α e contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Aumento de 200x.

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que a ação analgésica do veneno de *Dinoponera quadriceps* no tratamento de úlceras cutâneas ocorre ainda nas primeiras horas de tratamento e atuam na diminuição da inflamação através da redução do infiltrado de células polimorfonucleares.

Úlceras cutâneas são eventos traumáticos que podem ser originados por diversos fatores, tendo uma grande prevalência como consequência secundária de outras doenças, tais como diabetes. Além de provocarem grande desconforto aos pacientes, ainda são responsáveis por gastos massivos com tratamentos que busquem aliviar a dor e deixar uma cicatriz esteticamente satisfatória, o que nem sempre é alcançado (KONDO; ISHIDA, 2010; SEN et al., 2010).

A dor decorrente desse tipo de trauma é caracterizada como inflamatória e seu surgimento depende da ativação de nociceptores que irão conduzir a informação dolorosa aos neurônios da medula espinal. Nociceptores são ativados mediante estímulos nocivos: calor, aplicação de pressão próxima à área de úlcera, frio (TEIXEIRA, 2009).

A liberação de mediadores inflamatórios por células inflamatórias na região lesada, tais como bradicinina, óxido nítrico, prostaglandinas, serotonina, citocinas e histamina, conduz à ativação dos nociceptores (TEIXEIRA, 2009). Esses mediadores têm por função aumentar a resposta inflamatória, permitindo maior migração de células através da promoção da vasodilatação e também atuando na manutenção do estado hiperalgésico (CASTRO, 2011).

Nesse sentido, o resultado obtido no teste dos filamentos de Von Frey aplicado junto às bordas das úlceras em animais previamente tratados com DqV indica que o estado hipernociceptivo foi alterado e a percepção do estímulo nocivo encontra-se diminuída nesses animais. Poucos estudos foram feitos com insetos da ordem dos Hymenoptera. Assim, podemos citar Merlo et al. (2011), que demonstraram que a melitina, composto proteico proveniente do veneno de *Apis mellifera*, quando injetado por via sub-cutânea, também é capaz de produzir um efeito antinociceptivo; Mortari et al. (2007), cujo trabalho apresentou o mesmo efeito em ratos pré-tratados com um peptídeo neuroativo obtido do veneno de *Polybia occidentalis*, uma espécie de vespa; e o trabalho pioneiro de Sousa e colaboradores (2012), cujos resultados mostraram que DqV atua diminuindo a hiperalgesia em modelos clássicos de nocicepção.

A fim de avaliar melhor sua atividade anti-inflamatória, foi realizada a contagem de células polimorfonucleares nas seções histológicas obtidas a partir das úlceras nos animais, que refletem o tipo de inflamação e o grau de cicatrização do tecido. Dentre os tipos celulares

que migram para o tecido lesionado podemos citar dois, cujos papéis são fundamentais no curso temporal de uma inflamação: neutrófilos e macrófagos. Ambos atuam na eliminação de patógenos através de fagocitose (HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, 2011). Neutrófilos liberam EROs, leucotrienos e prostaglandinas, enquanto macrófagos liberam citocinas inflamatórias – IL-1, IL-6, TNF- α . Além disso, desempenham importante função na reparação do tecido – com a liberação de TGF- α , TGF- β , VEGF, entre outros fatores de crescimento (KONDO; ISHIDA, 2010).

A migração de neutrófilos do interior dos vasos para áreas lesadas é influenciada por fatores químicos e mecânicos. Estímulos quimiotáticos e inflamatórios, como a presença de TNF- α e IL-1, contribuem para a expressão de moléculas de adesão – selectinas, integrinas – e o consequente rolamento das células para o interior da área danificada (WAGNER; ROTH, 2000).

A diminuição no número de células inflamatórias na região da lesão foi observada para as primeiras horas do curso temporal da inflamação. Essa diminuição foi mais pronunciada em animais tratados com DqV, inclusive quando comparados com o controle positivo celecoxib em dois dos tempos avaliados. Com a diminuição no número de PMN sugere-se que há uma subsequente diminuição na quantidade de todos os produtos derivados destes, inclusive de prostaglandinas (WRIGHT et al., 2010). As PG são os principais mediadores da hiperalgesia e são derivadas da clivagem do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (COX) (BOTTING, 2006). Os anti-inflamatórios, de maneira geral, atuam bloqueando a ação dessa enzima, que possui duas isoformas – COX-1 e COX-2. Anti-inflamatórios mais modernos – como o celecoxib –, utilizam um mecanismo de seletividade para COX-2 (SAKATA; ISSY, 2004b). Assim, DqV pode estar contribuindo na redução dos níveis de PGs e, consequentemente, modulando a dor e a inflamação nas úlceras traumáticas.

Os escores atribuídos para cada estágio de desenvolvimento da inflamação não permitem chegar a uma conclusão quanto à eficácia do veneno na regressão do estado inflamatório, pois, apesar de poder-se observar nas imagens uma diferença entre os grupos salina e DqV quanto à presença de ectasia de vaso, quantidade de células inflamatórias no tecido conjuntivo e presença de hemorragia e áreas de necrose. O sistema de escores utilizado faz uma avaliação qualitativa da inflamação e cicatrização, não sendo capaz de diferenciar a intensidade desta inflamação aguda e do infiltrado celular. Assim, sugere-se a utilização de metodologias quantitativas – ELISA, ensaio de azul de Evans – para investigar as alterações na intensidade da resposta inflamatória aguda após tratamento com DqV.

Na tentativa de corroborar os dados obtidos com a contagem de PMN, foi realizado ensaio imunohistoquímico (IHQ) com o anticorpo anti-TNF- α . Essa citocina é largamente produzida por plaquetas, neutrófilos e, principalmente, macrófagos, no local da inflamação. Com ação pró-inflamatória, TNF- α regula a cascata inflamatória de produção de citocinas, sendo considerado peça-chave para a geração de resposta inflamatória (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). Outra função relacionada a essa citocina é a indução da liberação de PGE₂ (VASSALLI, 1992). Portanto, esta citocina possui papel nos mecanismos envolvidos na migração de neutrófilos e no desenvolvimento da hiperalgisia inflamatória, ambos processos possivelmente modulados pelo DqV.

Entretanto, os dados obtidos não puderam confirmar tal ideia. Apesar de ser observada discreta diferença visual na marcação entre os grupos controle (salina) e DqV, não houve significância estatística, talvez por:

1. O número de animais de experimentação tenha sido insuficiente para se obter uma diferença estatística significativa;
2. O TNF- α não esteja envolvido no efeito do veneno.

A técnica de imunomarcagem nos permite verificar não só a existência de determinada substância, mas também onde ela se localiza, pois pode-se observar a morfologia da célula que contém a molécula. Entretanto, ela apresenta limitações: nem todos os antígenos são preservados ou podem ser marcados; sua sensibilidade e especificidade não são tão grandes quando comparadas a dosagens e PCRs; e ela permite apenas a avaliação semi-quantitativa de uma substância marcada (SCHACHT; KERN, 2015).

Essa questão da análise semi-quantitativa aponta para uma nova investigação, por meio de dosagens do próprio TNF- α , além de outros marcadores moleculares compatíveis com outras substâncias do processo inflamatório e hiperalgésico, tais como prostaglandinas, bradicinina, substância P e IL-1, para confirmação da ação anti-inflamatória do veneno de *D. quadriceps*.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o veneno de *Dinoponera quadriceps* apresenta ação antinociceptiva e potencial ação anti-inflamatória, na dose administrada, no tratamento de úlceras cutâneas traumáticas. A ação antinociceptiva e a ação anti-inflamatória parecem estar relacionadas à redução na migração de células polimorfonucleares durante as primeiras horas da inflamação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. A.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO, J.; JORDÃO-JR, A. A.; FRADE, M. A. C. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 1036-47, 2011.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 407-422, 1991.

BALDO, M. V. C. Somestesia. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 266-278.

BESSON, J. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 8 maio 1999.

BOTTING, R. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, n. 1, p. 208-219, 2006.

CASTRO, R. A. DE. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico. **Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico**. 2011.

CLARK, R. A. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2. ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1996.

COSTA NETO, E. M. A zooterapia popular no Estado da Bahia: registro de novas espécies animais utilizadas como recursos medicinais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1639-1650, 2011.

COSTA-NETO, E. M. **Entomotherapy, or the Medicinal Use of Insects**. Disponível em: <file:///Users/beatrizadjafre/Downloads/Entomotherapy, or the medicinal use of insects.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2016.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 2005.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British journal of anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 1 jul. 2008.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 283-9, 1 jan. 2004.

ENOCH, S. et al. The oral mucosa: A model of wound healing with reduced scarring. **Oral Surgery**, v. 1, n. 1, p. 11-21, 2008.

FAIRWEATHER, M. et al. Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing. **The Journal of surgical research**, v. 194, n. 2, p. 717-24, 2015.

- FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 9, n. 1, p. 3–7, jan. 2008.
- FERREIRA, K. A. S. L.; TEIXEIRA, M. J. Princípios gerais para o tratamento da dor. In: DE SOUSA, L. Á. (Ed.). . **Dor: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 1438.
- FERREIRA, S. H. et al. Dor inflamatória. In: DE SOUZA, L. Á. (Ed.). . **Dor: princípios e práticas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 265–279.
- FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free radical biology & medicine**, v. 42, n. 2, p. 153–64, 15 jan. 2007.
- HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing and wound assessment. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 475–479, 2011.
- HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S206–S212, nov. 2006.
- HUNT, T. K.; HOPF, H. W.; UENO, C. Using Physiology to Improve Surgical. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 59–71, 2006.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–10, 13 set. 2001.
- KHANSARI, N.; SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 73–80, 2009.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1-3, p. 93–98, 2010.
- LEE, J.-H. et al. Bee Venom Pretreatment Has Both an Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effect on Carrageenan-Induced Inflammation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 3, p. 251–259, 3 maio 2001.
- LEES, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 4, p. 385–99, jan. 2003.
- LIMA, D. B. et al. Antimicrobial effect of *Dinoponera quadriceps* (Hymenoptera: Formicidae) venom against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 390–396, 2014.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607–9, 8 maio 1999.
- LOPES, K. S. et al. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 3, p. 141–145, 2013.

- MADEIRA, J. C. et al. No Title No Title. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 9, p. 1607–1609, 2015.
- MATHIAS, M. I. C. Glândulas de veneno em formigas. **O Biológico**, v. 69, p. 229–233 (pp. 234 & 235 are blank), 2007.
- MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological reviews**, v. 86, n. 1, p. 279–367, jan. 2006.
- MERLO, L. A. et al. Effects induced by *Apis mellifera* venom and its components in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 764–771, 2011.
- MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Der Anaesthetist**, v. 46, n. 2, p. 142–53, fev. 1997.
- MIGNATTI, P. et al. Proteinases and tissue remodeling. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, p. 427–474, 1996.
- MORTARI, M. R. et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 860–869, 2007.
- NOGA, D. A. M. F. et al. Pro- and Anticonvulsant Effects of the Ant *Dinoponera quadriceps* (Kempf) Venom in Mice. **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 4, p. 410–417, 2015.
- OLIVEIRA, L. F. Princípios gerais do tratamento farmacológico da dor. In: DE SOUSA, L. Á. (Ed.). **Dor: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, p. 1438, 2009.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.
- SAJEM BETLU, A. L. Indigenous knowledge of zootherapeutic use among the Biate tribe of Dima Hasao District, Assam, Northeastern India. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 9, p. 56, jan. 2013.
- SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar: dor**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2004a.
- SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Anti-inflamatórios. In: SCHOR, N. (Ed.). **Dor**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, p. 141–152, 2004b.
- SCHACHT, V.; KERN, J. S. Basics of Immunohistochemistry. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 3, p. e30–4, 2015.
- SEN, C. K. et al. Health and the Economy. **Wound Repair Regen**. 2009, v. 17, n. 6, p. 763–771, 2010.

SIEFERT, S. A.; SARKAR, R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. **Vascular**, v. 20, n. 4, p. 210–6, ago. 2012.

SINGER, ADAM J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing - Review. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, 1999.

SON, D. J. et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246–270, 2007.

SOUSA, P. L. et al. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera* quadriceps. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 213–6, 2012.

SOUSA, P. L. **ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E INFLAMATÓRIA DO VENENO DE *Dinoponera quadriceps* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE: PONERINAE) EM CAMUNDONGOS.** [s.l: s.n.].

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor. In: DE SOUZA, L. Á. (Ed.). . **Dor: princípios e práticas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 145–175, 2009.

TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A F. Angiogenesis in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 40–46, 2000.

VASSALLI, P. The Pathophysiology of. **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 411–452, 1992.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil Migration Mechanisms , with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature 1. v. 52, n. 3, p. 349–374, 2000.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618–1631, 2010.

ANEXO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28794-1	Data da Emissão: 26/05/2011 08:56
Dados do titular	
Nome: Alba Fabiola Costa Torres	CPF: 047.609.124-10
Título do Projeto: Veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> : potencial fonte de substâncias bioativas	
Nome da Instituição : UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	CNPJ: 07.272.636/0001-31

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das formigas	06/2011	06/2013
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O membro da equipe estrangeiro Yves Patric Quinet possui vínculo empregatício efetivo com instituição científica brasileira. Dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Alice Maria Costa Martins	Coodenador do Projeto	434.316.903-00	2000002449858 ssp-CE	Brasileira
2	maria goncalves pereira	Pesquisador Colaborador	535.089.391-20	2000010056280 ssp-CE	Brasileira
3	Cláudia Ferreira Santos	Pesquisador colaborador	391.523.593-87	2008009242011 SSP-CE	Brasileira
4	Nilberto Robson Falcão do Nascimento	Pesquisador Colaborador	888.336.073-72	99002176768 SSP-CE	Brasileira
5	ALEXANDRE HAVT BINDA	Pesquisador colaborador	437.261.943-04	-	Brasileira
6	Yves Patric Quinet	Pesquisador colaborador	622.044.673-91	V194120.V DIREX/DPF-CE	Estrangeira
7	Ana Maria Sampaio Assereuy	Pesquisador colaborador	039.789.902-53	066740630 SSP-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CRATEUS	CE	Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra das Almas	Fora de UC

Atividades X Taxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14936591



Página 1/3

ANEXO



Comitê de Ética para o Uso de Animais
 Av. Paranjana, 1700- Itaperi, fone: 3101-9890
 e-mail: ceua.uece@uece.br
 página na internet: www.uece.br/ceua




CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que o **Projeto de Pesquisa intitulado: "Avaliação do efeito anti-nociceptivo do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* em úlceras cutâneas traumáticas em camundongos"** registrado sob número 1776865-2015 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE). Este certificado expira em 05/08/2019.

Vigência do projeto	abril de 2015 – abril de 2019.
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss
Número de animais	135
Peso/idade	25-30g
Sexo	135
Origem:	Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas

Fortaleza, 25 de abril de 2015


 Prof. Dr. Nilton Roberto do Nascimento
 Coord. da comissão de ética
 no uso de animais - CEUA